

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Uudse RAT-ChIP meetodi arendamine histooni modifikatsioonide uurimiseks väikesest

hulgast rakkudest

Bakalaureusetöö

12 EAP

Rita Kreevan

Juhendaja PhD Tõnis Org

TARTU 2018

SISUKORD

<i>INFOLEHT</i>	4
<i>KASUTATUD LÜHENDID</i>	5
<i>SISSEJUHATUS</i>	6
<i>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</i>	7
1.1 Kromatiini struktuur.....	7
1.2 Histonide post-translatsioonilised modifikatsioonid.....	7
1.3. Kromatiini immuunosadestamine (ChIP).....	8
1.4 Kromatiini immuunosadestamise etapid.....	10
1.4.1 Ristsidumine.....	10
1.4.2 Rakkude lüüsimine.....	10
1.4.3 Kromatiini fragmenteerimine.....	11
1.4.4 Immuunosadestamine.....	11
1.4.5 Ristsidemete eemaldamine ja DNA puhastamine.....	11
1.4.6 DNA detekteerimine.....	12
1.5 Väikserakulised ChIP-seq meetodid.....	13
1.5.1 MINT-ChIP.....	15
1.5.2 ChIPmentation.....	16
1.5.3 LinDA-ChIP-seq (<i>Single tube lineaar DNA amplification</i>).....	17
<i>2. EKSPERIMENTAALNE OSA</i>	18
2.1 EESMÄRGID.....	18
2.1 MATERJAL JA METOODIKA.....	19
2.2.1 Rakuliinid.....	19
2.2.2 Restriksiooniensüümide testimine.....	19
2.2.3 DNA puhastamine.....	20
2.2.4 Gelelektroforees.....	20
2.2.6 qPCR.....	22
2.2.7 Sekveneermistulemuste analüüs.....	22
2.2.8 Korrelatsioonianalüüs.....	23
2.2.9 H3K4m3 ja H3K27me3 signaali profiilid.....	23
2.2.10 Sekveneermistulemuste võrdluseks kasutatud avalikud andmed.....	23

<i>Tabel 5. RAT-ChIP-seq võrdluseks kasutatud avalikult kättesaadavad andmed.</i>	24
<i>2.3 TULEMUSED</i>	24
2.3.1 Kromatiini fragmenteerivad restriksiooniensüümid	24
2.3.2 qPCR-i tulemused	27
2.3.3 Sekveneerimistulemused	28
.....	30
.....	31
<i>2.4 ARUTELU</i>	32
<i>KOKKUVÕTE</i>	34
<i>SUMMARY</i>	35
<i>TÄNUSÕNAD</i>	37
<i>KASUTATUD KIRJANDUS</i>	38
<i>KASUTATUD VEEBIAADRESSID</i>	41
<i>LISAD</i>	42
Lisa 1	42
Lisa 2	42
Lisa 3	43
Lisa 4	43
<i>LIHTLITSENTS</i>	44

INFOLEHT

Uudse RAT-ChIP meetodi arendamine histooni modifikatsioonide uurimiseks väikesest hulgast rakkudest

Käesolev bakalaureusetöö annab ülevaate kromatiini immuunosadestamise meetodist ning selle kasutamisevõimalustest uurimaks erinevaid valk-DNA interaktsioone. Eksperimentaalses töös tutvustatakse uutset RAT-ChIP meetodi arendust ja uuritakse aktiivseid ja inaktiivseid histoonide modifikatsioone, kasutades selleks 100 rakku.

Märksõnad: ChIP, RAT-ChIP, histoonid, kromatiini immuunosadestamine

CERCS kood: T490 Biotehnoloogia

Developing a novel RAT-ChIP method for studying histone modifications form a small number of cells

This bachelor thesis provides an overview of the chromatin immunoprecipitation method and explores its' uses to study various protein-DNA interactions. The experimental work introduces the development of a novel RAT-ChIP method by studying active and inactive histone modifications using 100 cells.

Keywords: ChIP, RAT-ChIP, histone, chromatin immunoprecipitation

CERCS code: T490 Biotechnology

KASUTATUD LÜHENDID

ChIP	kromatiini immuunosadestamine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FBS	veise loote seerum (<i>fetal bovine serum</i>)
H1229	inimese kopsu kartsinoomi rakuliin
H3K4me3	histoon H3 4. lüsiini trimetülatsioon
H3K4me2	histoon H3 4. lüsiini dimetülatsioon
H3K4me1	histoon H3 4. lüsiini monometülatsioon
H3K36	histoon H3 36. lüsiin
H3K27me3	histoon H3 27. lüsiini trimetülatsioon
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IP	immuunosadestamine
K562	inimese erütroleukeemia rakuliin
NGS	Järgmise põlvkonna sekveneerimine
NL	tuuma lüüsi puhver
NP-40	nonüülfenoksüpolüetoksüetanool
N- ChIP	natiivne kromatiini immuunosadestamine
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
X-ChIP	ristseotud kromatiini immuunosadestamine

SISSEJUHATUS

Inimkeha koosneb vähemalt kahesajast erinevast rakutüübist. Rakkude vastus rakuvälistele ja rakusisestele signaalidele sõltub nende päritolust ja nende identiteedist. Vaatamata sellele, et ühe organismi erinevatel rakkudel on identsed genoomid võivad nad reageerida samadele signaalidele märgatavalt teistsugusel viisil. Seetõttu on rakkudes mehhanismid, mis määravad ja säilitavad iga rakutüübi identiteedi. On üha selgemaks saanud, et rakkude identsuse spetsiifika ja identiteedi säilitamist kontrollivad epigeneetilised sündmused. Need epigeneetilised sündmused, mis hõlmavad DNA metülatiooni ja histoonide post-translatioonilisi modifikatsioone mõjutavad kromatiini struktuuri ja DNA ligipääsetavust, reguleerides seeläbi geeniekspressiooni. Avatud kromatiin võimaldab gene reguleerivatel valkudel nagu transkriptsioonifaktoritel või remodelleerivatel kompleksidel interakteeruda reguleerivates regioonides kindlate järjestusega. Need protsessid on organismi normaalse arengu ja rakutüüpide eristamise jaoks väga olulised. Kromatiini dünaamilise struktuuri ja sellega seotud valkude iseloomustamine on olulise tähtsusega, et mõista rakkude kasvu ja diferentseerumist. Selliste muustrite ja valk-DNA interaktsioonide kaardistamine on aastatega oluliselt paranenud just tänu sekveneerimistehnoloogia arengule. Tänapäevaseks eelistatud meetod valk-DNA interaktsioonide uurimiseks on kromatiini immuunosadestamine (ChIP) kombineerituna järgmisepõlvkonna sekveneerimisega (ChIP-seq). ChIP-i kasutamine histoonide uurimisel on andnud meile parema arusaama kromatiini struktuursetest muutustest, mis kaasnevad geeniekspressiooni muutustega. Kuigi ChIP-seq on andnud meile võimaluse uurida epigeneetilisi sündmusi on ka sellel meetodil omad limiteerivad küljed. Üldjuhul vajab tavapärane ChIP algmaterjalina üsna suure hulga rakke - miljoneid, seega ei ole võimalik kasutada meetodit seal, kus materjali hulk on piiratud. Tänu tehnika arengule on siiski viimastel aastatel välja tulnud mitmete ChIP-seq meetoditega, mis võimaldaksid algmaterjalina kasutada kordades vähem rakke.

Antud bakalaureusetöö eesmärgiks on anda ülevaade ChIP-seq meetodist ning selle kasutamisevõimalustest. Eksperimentaalse töö eesmärgiks oli osaleda uudse RAT-ChIP-(seq)(Restrictase Assisted Taggmentation – Chromatin immunoprecipitation) meetodi välja arendamises, millega oleks võimalik detekteerida erinevaid histoonide modifikatsioone kasutades selleks vaid 100 rakku.

Märksõnad: RAT-ChIP, kromatiini immuunosadestamine, ChIP, histoonid

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Kromatiini struktuur

Inimese genoomis on ligikaudu 6 miljardit aluspaari DNA-d, mis on koos temaga seondunud valkudega pakitud kromatiiniks, et reguleerida mitmesuguseid bioloogilisi protsesse (Cooper, 2000). Kromatiin mängib olulist rolli igas rakus, reguleerides geenide ekspressiooni, rakujagunemist ning DNA parandamist (Park, 2009). See kuidas kromatiin on pakitud ning modifitseeritud on eristatav erinevates kudedes, organismi arenguetappides ning haigusseisundites (O'Geen et al., 2011).

Kromatiini põhiühikuks on nukleosoom, mis koosneb histooni oktameerist ning selle ümber keerdunud DNA-st. Histoonid sisaldavad aluselisi aminohappeid (arginiin ja lüsiin), mis hõlbustavad seondumist negatiivselt laetud DNA molekulidega. Iga histooni oktameer koosneb neljast dimeerist: H2A-H2B ja H3-H4 paaridest (Hauer and Gasser, 2017). Nukleosoomidest ulatuvad välja histoonide lüsiini rikkad N-terminaalsed sabad, mis on olulised kromatiini pakkimisel ning mille kaudu reguleeritakse DNA kättesaadavust mitte-histoonsetele valkudele. Histooni oktameere ühendab omavahel 'pärlikee' struktuuriks *linker* DNA (Happel and Doenecke, 2009).

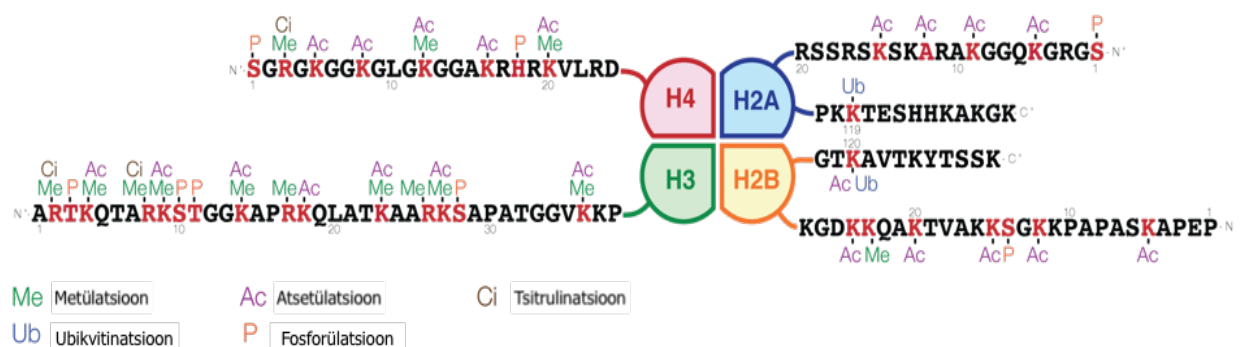
Kromatiinis võib eristada heterokromatiini ning eukromatiini, millest heterokromatiin on transkriptsiooniliselt inaktiivne ning sisaldab korduvaid DNA järjestusi. Eukromatiini all mõistetakse transkriptsiooniliselt aktiivseid piirkondi, mis ei ole nii tihedalt pakitud ning on seetõttu lihtsamini ligipääsetavad. Selline kromatiini struktuuri vaheldumine on tingitud histooni sabade erinevatest keemilistest modifitseerimistest (Grewal and Jia, 2007).

1.2 Histoonide post-translatsioonilised modifikatsioonid

DNA ja histoonide muutused vastavalt erinevatele signaalidele mängivad geeni regulatsioonis olulist rolli ning selle täpsemaks mõistmiseks on vajalik valgu-DNA interaktsioonide ja epigeneetiliste märkide kaardistamine. Muutes kromatiini DNA-siduvatele valkudele kergemini või raskemini ligipääsetavamaks saab mõjutada transkriptsiooni ja seeläbi geeniekspressiooni (Park, 2009). Histoonide modifikatsioonid hõlmavad väljaulatuvate N-terminaalsete „sabade“ modifitseerimist erinevate keemiliste rühmadega (Joonis 1) (Baker et al., 2015). Modifikatsioonid nagu atsetülatsioon on tüüpiliselt seotud avatud ja ligipääsetava kromatiini regioonidega, samas kui histoonide „sabade“ metüleerimine on seotud kas avatud või kinnise kromatiiniga, sõltuvalt konkreetsest metüleeritud aminohappest (Barski et al., 2007).

Näiteks histoon H3 lüsiin 4 mono- või trimetülatsioon ja histooni H3 trimetülatsioon lüsiinil 36 on seotud avatud kromatiiniga, kuid kõik need modifikatsioonid esindavad erinevat avatud

kromatiini kategooriat. Transkriptsioonilised aktivaatorid võivad seonduda otse H3K4me3 ja H3K4me2 modifikatsioonidele, mis märgivad geeni promootor piirkondi, H3K4me1 viitab transkriptsioonilistele enhanseritele ja H3K36 tähistab genoomi transkribeeritavaid piirkondasid (Barski et al., 2007). H3K27me3 on histooni H3 N-terminaalse “saba” metülatsioon, mis reguleerib lähedal olevaid gene heterokromatiini moodustumise kaudu (Ferrari et al., 2014). Trimetüülitud H3K27 on inaktiivsete geenide promootoritel või katab terve geeni keha surudes alla geenide transkriptsiooni. Samas H3K27me1 seostatakse just aktiivsete promootoritega, avaldades positiivset mõju transkriptsioonile (Ferrari et al., 2014).



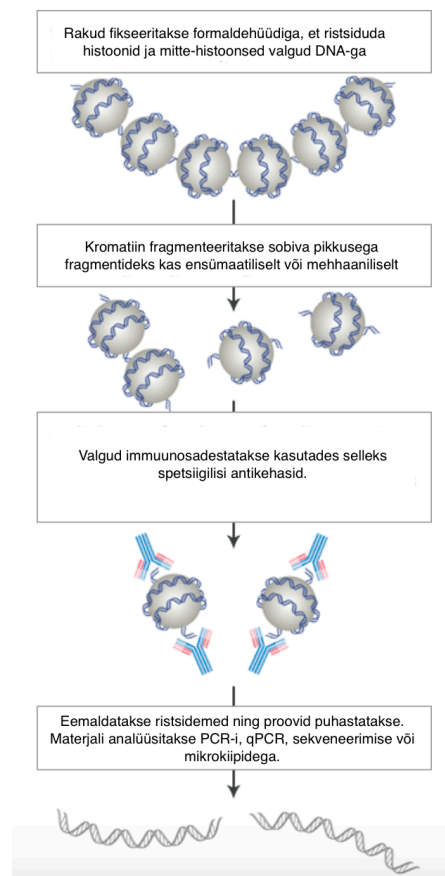
Joonis 1. Histooni sabadeerinevad post-translatsioonilised modifikatsioonid. Joonisel on näidatud levinumad histooni 'sabade' modifikatsioonide asukohad ning aminohappe jäägid, mida saab keemiliselt modifitseerida (Rodríguez-Paredes and Esteller, 2011).

1.3. Kromatiini immuunosadestamine (ChIP)

Kromatiini immuunosadestamine (ChIP) (Joonis 2) on meetod, mille abil huvipakkuv valk selektiivselt eraldatakse kromatiinipreparaatidest, et määrata kindlaks sellega seotud DNA järjestused. ChIP on laialdaselt levinud meetod, et uurida post-translatsiooniliselt modifitseeritud histoone, histooni variante ja transkriptsioonifaktoreid. ChIP meetod on aastatega aidanud paremini mõista DNA-valkude vahelisi interaktsioone ja histoonide modifikatsioonide rolli rakkudes (Collas, 2010).

Kromatiini immuunosadestamine on jagatud algmaterjali töötamise poolest kaheks: natiivne ChIP (N-ChIP) ja ristsidemetega ChIP (X-ChIP). X-ChIP-i puhul ristseotakse valgud ja DNA kovalentselt formaldehüüdiga või UV-ga ning fragmenteeritakse sonikeerimisega. Siiski eelistatult tehakse ristsidumine formaldehüüdiga kuna UV töötlemisega saadud ristsidemed ei ole tagasi pööratavad. Mehhaaniline fragmenteerimine on vajalik kuna ristsidemed piiravad nukleaasi ligipääsu lõigatavatele kohtadele ning fragmenteerimine nukleasiga ei ole siin efektiivne. Vastupidiselt X-ChIP-le jäetakse N-ChIP protokollides ristsidumise etapp vahele

ning natiivne kromatiin saadakse rakutuuma töötlemisel mikrokokk nukleasiga (MNase) (Turner, 2001). Kuna N-ChIP põhineb mitte fikseeritud ehk natiivse kromatiini kasutamisel vajab antud meetod stabiilseid interaktsioone DNA ja valkude vahel (David et al., 2017). Seega sobib N-ChIP kõrge anfiinsusega valkude analüüsimiseks, näiteks histoonsete valkude jaoks. Tänu kõrge anfiinsuse tõttu puudub vajadus histoonseid valke ristsiduda DNA külge, vähendades seeläbi lisa etappe protokollis. Lisaks on N-ChIP-il eelis X-ChIP-i ees kuna antikeha spetsiifiline seondumine on ennustatav ning antikeha juurdepääs epitoopidele ei ole varjatud ristseotud valkudega (O'Neill, 2003). Enamik mitte-histoonsete valkude puhul on sobivamaks meetodiks X-ChIP, kuna mitte-histoonsete valgud ei jää seotuks DNA-ga nukleasiga töötlemise ajal. Samas X-ChIP puhul võib olla kromatiini sadestamine ebaefektiivne ning materjali saagis on väiksem (O'Neill, 2003). Meetodi valikul tuleb lähtuda algmaterjalist ning sellest, millised on uuritavate valkude omapärad.



Joonis 2. Kromatiini immuunosadestamise meetodi ülevaade. Joonisel on välja toodud lühidalt kromatiini immuunosadestamise etapid (Cellsignal).

1.4 Kromatiini immuunosadestamise etapid

1.4.1 Ristsidumine

Kromatiini immuunosadestamist alustatakse DNA-valkude kompleksi kovalentse stabiliseerimisega. Samas on ristsidumine valikuline ning teatud valkude nagu histoonide puhul ei ole vajalik kuna nad omavad suurt anfiinsust DNA suhtes. *In vivo* ristseostamine saavutatakse traditsiooniliselt formaldehüüdiga, saab kasutada ka UV valgust, kuid sel juhul on ristsidemed pöördumatud. Formaldehüüd on võimeline ristsiduma ainult väga lähestikku asuvaid molekule ja seega kasutatakse teda teiste *cross-linkeritega* nagu EGS ja DSG (Orlando, 2000). Lisa ristsidujatega saab siduda ka üksteisest kaugemal asuvaid valke (Collas, 2010). Ristsidumise aeg tehakse kindlaks empiiriliselt, kuid enamasti on valgud ristseotud mõne minutiga. Kasutades formaldehüüdi peaks olema tähelepanelik võimalike probleemide suhtes. Liigne ristsidumine võib tekitada mitmeid probleeme, näiteks vähendada antigeeni kättesaadavust. Kuna pikaajaline ristsidumine soodustab nukleosoomiga seotud valkude seondamist siis maskeeritakse seeläbi histooni epitoobid. Lisaks on formaldehüüd mõõdukalt denatureeriv aine ja teadaolevalt kahjustab see sekundaarset, eriti tertsiaarset struktuuri, mille tõttu võivad valgud lahti voltuda. Valkude üldine tundlikus formaldehüüdi suhtes määratakse kindlaks empiiriliselt. Formaldehüüdi kui ristsiduva aine kasutamise peamine eelis on see, et ristsidemed on täielikult pöörduvad. See saavutatakse peamiselt imiinorühmade protoneerimisega vesilahuses madala pH juures või kuumutamisega 68°C juures (Browne et al., 2014; Tian et al., 2012).

1.4.2 Rakkude lüüsimine

Lüüsi etapis ekstraheeritakse ristseotud valgu-DNA kompleksid rakkudest või kudedest ning viiakse need lahusesse. Lahustades rakumembraani detergendipõhiste lahustega, vabanevad lahusesse rakulised komponendid. Kuna valgu-DNA vastasmõjud esinevad peamiselt tuumas, võib tsütosoolsete valkude eemaldamine vähendada tausta ja suurendada tundlikkust. Juhul kui ristseondamine on tehtud, siis detergentide või soolade olemasolu ei mõjuta valk-DNA komplekse, kuna esimese sammuna saavutatud kovalentne ristsidumine hoiab valk-DNA komplekse stabiilsena kogu ChIP protseduuri (Browne et al., 2014).

Samaaegseks rakukesta ja tuuma lüüsimiseks kasutatakse lüüsipuhvrit, mis sisaldab 1% SDS-i (Browne et al., 2014). ChIP lüüsipuhvrid sisaldavad proteaasi inhibiitoreid, tagades, et rakus olevad proteaasid ei lagundaks lüsaadis olevaid valke enne immuunosadestamist. Sõltuvalt uuritava sihtmärgi olemusest võib lüüsipuhvrissi lisada fosfataasi ja kinaasi inhibiitoreid, samuti deatsetülaasi inhibiitoreid (Spencer, 2003).

Lüsaadi osmootsuse reguleerimiseks sisaldavad lüüsi puhvrid soolalahuseid nagu NaCl või KCl. Membraanse struktuuri lõhkumiseks sisaldavad puhvrid detergente, näiteks TritonX-100 või SDS-i. Laialdasemalt kasutatakse ChIP analüüsis kas TritonX-100 või NP-40 (Ji, 2010).

1.4.3 Kromatiini fragmenteerimine

Valkudega seonduvate järjestuste analüüsiks on vaja kromatiin teha väiksemateks analüüsitavateks tükkideks. Kromatiini fragmenteerimine saavutatakse mehaanilise ultraheli töötusega või ensümaatilise mikrokokk-nukleaasi (MNase) töötusega (Carey et al., 2009).

Olenevalt tingimustest jäävad sonikeerimisega saadavad fragmendid 200 kuni > 1000 aluspaari vahele. Kuna sonikeerimise käigus eraldub soojus peab olema ettevaatlik, sest kõrge temperatuur võib valke denatureerida, mis vähendab valkude tuvastamist antikehade poolt (Gade and Kalvakolanu, 2012). MNaas teeb lõiked eelistatud nukleosoomide vaheliselt alalt, kus DNA ei ole kaitstud ning on lihtsamini ligipääsetav (Gade and Kalvakolanu, 2012). Fragmenteerimise efektiivsust ning saadud fragmentide suurust hinnatakse peale ristsidemete eemaldamist ja DNA eraldamist agarosgeelil (Brind'Amour et al., 2015; Browne et al., 2014).

1.4.4 Immuunosadestamine

Spetsiifilise modifitseeritud histooni, transkriptsioonifaktori või huvipakkuva kofaktori isoleerimiseks kasutatakse lähtuvalt katse eesmärgist valitud antikehasid (Carey et al., 2009). Sobivate antikehade valik on kriitiliseks parameetriks eduka ChIP analüüsi jaoks. Sihtmärk valkude puhul, mille jaoks ei ole ChIP-is töötavaid antikehi saadaval, on võimalik ekspresseerida rakkudes HA, myc ja GST märgistega liitvalke, seejärel immuunosadestamiseks kasutada anfiinsusmärgiste vastu suunatud antikehi.

Antikeha-valgu-DNA kompleks puhastatakse anfiinselt kasutades antikehi siduvaid molekule, näiteks tahkele kandjale immobiliseeritud valk A, valk G või valk A/G. Antud valgud seonduvad antikeha mittevariaable osaga, olles ise seotud näiteks magnetkeradele. Selleks, et vähendada tausta, võib blokeerida antikeha siduvad kerad nukleiinhappe ja valkude blokeerimis puhvriga. Ebaspetsiifikat saab eemaldada pestes proove erinevate pesulahustega, nagu näiteks RIPA(*Radioimmunoprecipitation assay buffer*), LiCl (*Lithium chloride*) ja TE (*Tris-EDTA*) puhvritega (Spencer, 2003).

1.4.5 Ristsidemete eemaldamine ja DNA puhastamine

Enne kui spetsiifilist DNA produkti saab mõõta ja amplifitseerida, tuleb valgu-DNA ristsidemed tagasi pöörata. Ristsidemete eemaldamine saavutatakse kõrgel temperatuuril (68°C) inkubeerimisega ning proteiinaas K töötusega (Browne et al., 2014). ProtK lõikab

alifaatsete, aromaatsete või hüdrofoobsete jääkide karboksüülsest poolt ning ProtK kasutakse sageli valkude eemaldamiseks DNA või RNA preparaatest. Lisaks elimineerib ProtK puhastatud DNA-st nukleasid, vältides edasist DNA lagundamist. DNA eraldamiseks valgu fragmentidest kasutatakse kas fenool-kloroformi koos standardse DNA puhastamismeetodiga või kommertsiaalselt kättesaadavaid kolonne (Spencer, 2003).

1.4.6 DNA detekteerimine

Selleks, et kindlaks teha valkude seondumiskohad, tuleb analüüsida saadud DNA fragmente (Haring et al., 2007). Konkreetsete DNA fragmentide detektsiooniks on olemas mitmesuguseid meetodeid ja valitud meetod määrab kindlaks, millises ulatuses andmeid saab kvantitatiivselt analüüsida. Kindla üksiku geeni analüüsimiseks kasutatakse kas tavalist polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) või reaalaia polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR). Alternatiivsed meetodid on 'slot-blot' ja mikrokiip analüüsid, mis tänu tehnika arengule on tänaseks vananenud meetodid (Haring et al., 2007). Ülegenoomsetest meetoditest on tänaseks enim kasutust leidnud järgmise põlvkonna sekveneerimine (NGS). Tänu oma võimele testida samaaegselt miljoneid fragmente on meil võimalus saada rohkem informatsiooni lühema aja ning suhteliselt vähesema raha eest.

1.4.6.1 Reaalaia polümeraasi ahelreaktsioon (qPCR)

Kuna ChIP signaalide hoolikas kvantiseerimine on andmete tõlgendamiseks oluline, on qPCR-il mitmeid eeliseid tavalise PCR-i ees (Haring et al., 2007). Kui PCR-i puhul saab produkti analüüsida kõikide tsüklite lõpus, siis qPCR-i eeliseks on produkti kvantitatiivne mõõtmine iga tsükli järel (Wong and Medrano, 2005). PCR-i produktide reaalaia tuvastamist võimaldab fluorestskeeriva reportermolekuli lisamine uuritavasse proovi, mille tulemusena kasvava DNA produkti kogus annab suurenenud fluorestsentsi signaali. Sel eesmärgil kasutatavad fluorestsentskemikaalid hõlmavad DNA-d siduvat värvainet ja fluorestsentsmärgisega järjestusspetsiifilisi *praimereid*. Fluorestsentssignaali jälgimiseks amplifikatsiooni ajal kasutatakse spetsiaalset tehnikat, mis on varustatud fluorestsentsdetektori moodulitega (Pfaffl, 2001). Reaalaia PCR viiakse läbi termotsükleris, milles proov ergastatakse kasutades kindla lainepikkusega valgust ning tuvastatakse fluorofoori poolt eraldunud fluorestsentsi (Pfaffl, 2001). Kontrollimaks, kas antud katse töötab, kasutatakse selleks negatiivseid ja positiivseid kontrole. Selle eesmärgiks on kinnitada, et meie antikeha on spetsiifiline ning ei tõmba alla mittespetsiifilist DNA-d. Selleks disainitakse *praimerid* sellisesse piirkonda, kus on teada, et meid huvitav modifikatsioon on olemas ning negatiivse puhul sinna, kus antud modifikatsioon

puudub. Lisaks võrreldakse proove taustaga, mis saadakse *input* proovist, mis koosneb fragmenteeritud kromatiinist, mida ei ole immuunosadestatud (Ferrari et al., 2014)

1.4.6.2 ChIP-seq

Kromatiini immuunosadestamine kombineerituna järgmise põlvkonna sekveneerimisega (NGS) on saanud üheks peamiseks meetodiks epigeneetika uuringutes. ChIP-seq on osutunud väärtuslikuks meetodiks transkriptsioonifaktorite ja kromatiini modifikatsioonide kaardistamiseks genoomses ulatuses (O’Geen et al., 2011). Üldiselt võrreldes ChIP-kiibiga on ChIP-seqil kõrgem signaali/müra suhe, meetod on odavam ja vajab väiksemas koguses ChIP DNA-d. Lisaks on oluline ka sekveneerimissügavus, mis on kriitiline tegur nõrgemate sidumiskohtade tuvastamisel. Raamatukogu valmistamisel on oluline üle täpsustada raamatukogu suurus ning eemaldada adapterdimeerid ning muud raamatukogu valmistamisel tekkinud artefaktid. Tavaliselt kasutatakse puhastamiseks magnetkeradel põhinevat puhastamist või puhastatakse saadud produkt agarosgeelil (Head et al., 2014). ChIP meetodi käigus fragmenteeritud ChIP DNA-le ligeeritakse külge adapterid, misjärel valmistatakse vajalik raamatukogu ning viiakse läbi amplifikatsioon. Amplifitseerimine näiteks Illumina platvormi puhul toimub tahkel pinnal, milleks kasutatakse nn. *flowcell*-i. Antud pinnal on adapteritega komplementaarsed oligod, millele hakatakse liitma DNA fragmente. Illumina Genome Analyzer kasutab sildamplifikatsiooni, mille tulemusena tekivad tahkele pinnale mitmed DNA klastrid, mis võivad koosneda 1000 amplikonist (Raha et al., 2010). Sekveneerimisel kasutatakse DNA polümeraasi ja pöördterminaatorit. Modifitseeritud nukleotiidid on märgistatud fluorestseeruva värviga, mille abil on hiljem võimalik järjestust tuvastada (Shendure and Ji, 2008).

1.5 Väikserakulised ChIP-seq meetodid

Tavalise ChIP-seq protokoll peamine piirang on see, et meetod vajab suurel hulgal algmaterjali ($\sim 10^7$ rakku). Aastate jooksul on traditsiooniliste protokollide täiustamiseks välja töötatud mitmeid meetodeid (Tabel 1), mis võimaldaksid uurida ka haruldasi rakutüüpe, kus saadav materjali hulk on väike (Furey, 2012; Park, 2009).

Traditsioonilistes ChIP-seq meetodites on vaja enne sekveneerimist läbida mitmeid etappe (rakkude fikseerimine, lüüsimine, kromatiini fragmenteerimine, immuunosadestamine, ristsidemete eemaldamine, DNA puhastamine, raamatukogu valmistamine, sekveneerimine), mille käigus on probleemiks materjali kadu, eriti kui töötada väga väheste rakkudega. Tänapäevaks on välja töötatud mitmeid protokolle, milles kasutatakse erinevaid meetodeid, et vähendada materjali kadu. Mitmed uuringud on kasutanud erinevaid 'kandjaid', kas histooni, mRNA-d

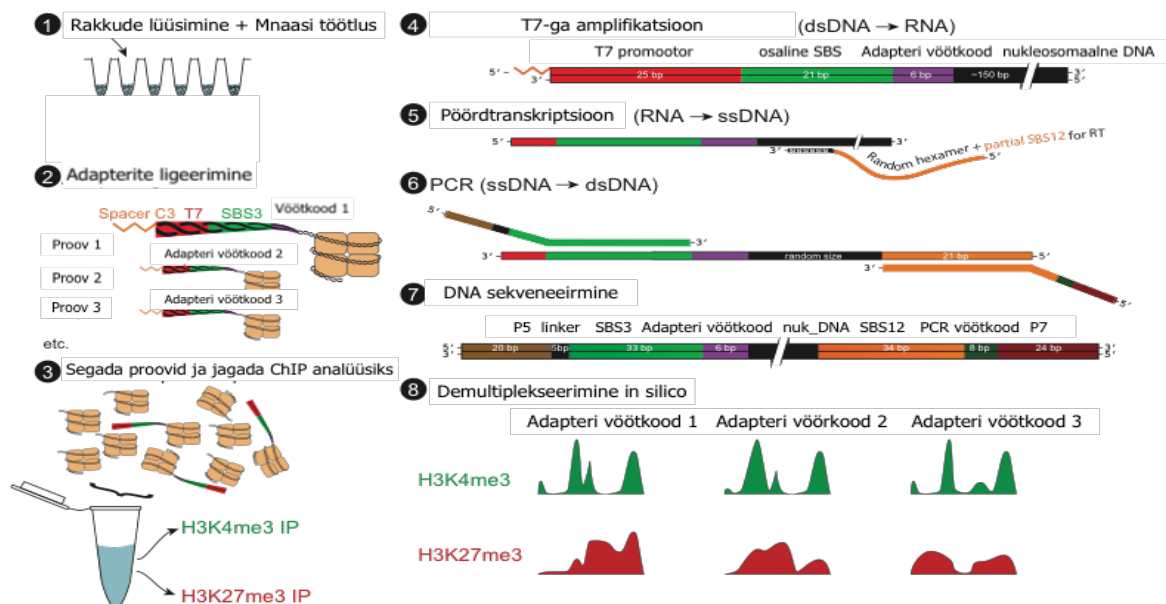
või kemikaale, mis mimikeerivad suuremat materjali hulka (Hao et al., 2008; Zheng et al., 2015; Zwart et al., 2013). Suurema materjali saamiseks kasutatakse koos ka mitmeid erinevaid proove, mis eelnevalt indekseeritakse (Lara-Astiaso et al., 2014; Rotem et al., 2015). Lisaks on meetodeid, milles kasutatakse spetsiaalset aparatuuri, et oleks võimalik uurida väikses koguses rakke (Cao et al., 2015; Rotem et al., 2015).

Tabel 1. Erinevad väikse algmaterjaliga ChIP-seq meetodid

Meetod	Vajalik rakkude arv	Mis on eripära?	Viide
μChIP-seq	500	'kandjad'- ristseotud rekombinantset histooni oktameerid	Dahl et al. 2016
STAR ChIP-seq	200	Raamatukogu valmistamine	Zhang et al. 2016
Low cell number ChIP-seq	10000	Uudne raamatukogu valmistamisviis	Adli et al. 2010
A carrier-assisted ChIP-seq	10000	'kandjad'- histoonid ja mRNA	Zwart et al. 2013
LinDA-ChIP-seq	5000	Uudne raamatukogu valmistamisviis	Shankaranarayanan et al. 2011
MINT ChIP-seq	500	Proovide indekseerimine	Van Galen et al. 2016
Single-cell ChIP-seq	1 (200)	Proovide indekseerimine	Rotem et al. 2015
iChIP-seq	10000	Proovide indekseerimine	Lara-Astiaso et al. 2014
ULI-NChIP-seq	1000, 200	Ensümaatiline fragmenteerimine	Brind'dAmour et al. 2015, Liu et al. 2016
ChIPmentation	10000	Uudne raamatukogu valmistamine	Schmidl et al. 2015
FARP-ChIP-seq	500	'kandja'- biotiiniga märgistatud DNA, bakteri rakud	Zheng et al. 2015

1.5.1 MINT-ChIP

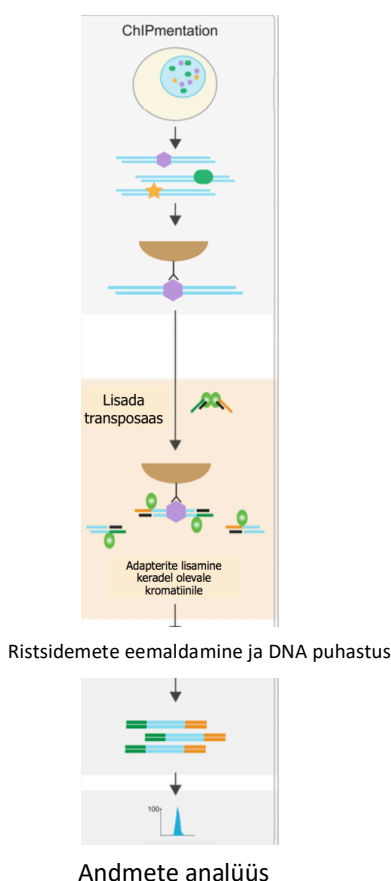
MINT-ChIP meetodis (Joonis 3) kasutatakse spetsiaalselt disainitud vöötkoodidega adaptereid, mis ligeeritakse fragmenteeritud nukleosoomse DNA ottesse. Kaheaahelised adapterid sisaldavad T7 promootorit ja Illumina SBS3 PCR 'priming' järjestust ning iga proovi jaoks spetsiaalset vöötkoodi. Lisaks on neil 5' otsas C3 'spacer', et välistada proovide iseeneslikku ligeerumist. T7 promootorit kasutatakse ChIP DNA amplifitseerimiseks *in vitro* transkriptsiooni reaktsioonis, et saada mitmeid RNA koopiaid. Amplifitseeritud RNA koopiaid pöördtranskribeeritakse kasutades juhuslikke heksameerseid *primereid*, mis on külgedelt ääristatud Illumina SBS12 PCR *priming* järjestusega. Saadava üksikahelalise cDNA mõlemas otsas on 'priming' järjestus ning neid kasutatakse, et valmistada raamatukogu iga ChIP proovi jaoks. Proovidele lisatakse raamatukogu valmistamise ajal PCR-i käigus teine vöötkood, et eristada erinevaid proove. Pärast sekveneerimist järjestused *demultiplekseeritakse* alguses esimese vöötkoodi järgi ning siis teise vöötkoodi järgi ja saadakse iga proovi jaoks eraldi järjestused. MINT-ChIP-i puuduseks on see, et kui rakkude arv on väga väike, siis informatsioon, mis meetodi käigus saadakse on väike. Sel juhu ei pruugita detekteerida nõrgalt märgistatud elemente. Lisaks ei saa antud meetodiga kaardistada transkriptsioonifaktoreid (van Galen et al., 2016).



Joonis 3. MINT-ChIP meetodi ülevaade. MINT-ChIP-is lüüsitakse rakud ning fragmenteeritakse MNaasiga. Teiseks toimub adapterite ligatsioon ning proovid segatakse kokku. Toimub *in vitro* transkriptsioon T7 abil. Tehakse pöördtranskriptsioon ning PCR. Proovid sekveneeritakse ning demultiplekseeritakse *in silico* (van Galen et al., 2016).

1.5.2 ChIPmentation

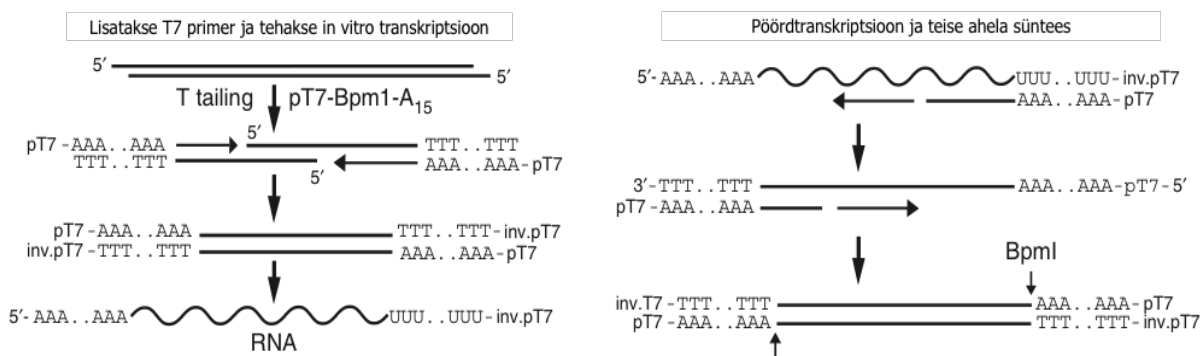
ChIPmentation protokoll algab tavapärase ChIP-iga, kus esmalt toimub rakkude fikseerimine formaldehüüdiga, rakud lüüsitakse, misjärel kromatiin fragmenteeritakse sonikeerimisega. ChIPmentation meetodis (Joonis 4) kasutatakse raamatukogu valmistamisel Tn5 transposaasi, mis ligeerib immuunosadestatud DNA fragmentidele sekveneerimise jaoks vajalikud adapterid. Antud juhul toimub kromatiini tagmenteerimine kinnitatuna magnetkeradele, et vältida DNA juppide liigset fragementeerimist. Pärast adapterite lisamist eemaldatakse ristsidemed ning puhastatakse DNA. Proovid amplifitseeritakse ning järgneb sekveneerimine. ChIPmentationi protokoll on kiire ja mugav, meetodi kasutamisel ei teki adapter dimeere ning meetod vajab algmaterjalina vähem rakke, kui tavapärased ChIP-id. Selline lähenemine võimaldab vähendada materjali kadu ning teeb meetodi kiireks ja odavaks (Schmidl et al., 2015).



Joonis 4. ChIPmentation meetodi ülevaade. Rakud fikseeritakse formaldehüüdiga, lüüsitakse ning kromatiin fragmenteeritakse sonikeerimisega. Materjal immuunosadestatakse spetsiifilise antikehaga, mis on kinnitatud magnetkeradele. Raamatukogu valmistamiseks lisatakse transposas ning lisatakse vajalikud adapterid tagmenteerimise teel. Eemaldatakse ristsidemed, puhastatakse DNA ning järgneb amplifikatsioon ja sekveneerimine (Schmidl et al., 2015).

1.5.3 LinDA-ChIP-seq (Single tube lineaar DNA amplification)

LinDA-ChIP meetodit alustatakse tavapärase ChIP protokolliga, kus rakud algselt fikseeritakse formaldehüüdiga ning fragmenteerimiseks kasutatakse sonikeerimist. LinDA-ChIP-is kasutatakse lineaarseks immuunosadestatud DNA amplifikatsiooniks T7 RNA polümeraasi. Kuna tavaliselt on materjali kadu suureks probleemiks, siis antud meetod viiakse läbi ühes tuubis ja amplifikatsioon tehakse ühes puhvris. Seega väheneb materjali kadumise oht. Enne amplifikatsiooni toimub terminaalse transferaasi abil DNA fragmentide 'T-tailing'. Teise ahela sünteesiks kasutatakse T7-poly(A) praimerite adapterit, see annab *in vitro* transkriptsiooniks sobiva kaheaahelalise matriitsahela. Praimerite ära lõikamiseks kasutatakse BpmI ensüümi ning saadudprodukte saab analüüsida ka järgmise põlvkonna sekveneerimisega (Joonis 5) (Shankaranarayanan et al., 2011).



Joonis 5. LinDA-ChIP-seq meetodi ülevaade. Esmalt lisatakse fragmentide otsadesse polü(T)- sabad. Sellele järgneb T7 promootoriga spetsiaalsete praimerite seondumine ning transkriptsioon. Saadud RNA fragmendile tehakse pöördtranskriptsioon ja sünteesitakse komplementaarne ahel (Shankaranarayanan et al., 2011).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 EESMÄRGID

Käesoleva bakalaureuse töö eesmärgiks oli osaleda uudse RAT-ChIP-seq (*Restrictase Assisted Taggmentation- Chromatin Immunoprecipitation*) meetodit arendamises, mis võimaldaks kromatiini immuunosadestamist teha väikese hulga rakkude pealt. Antud bakalaureusetöö eesmärkideks oli:

1. Testida erinevaid restriksiooniensüüme ning leida sobiv ensüümide kombinatsioon, mis võimaldaks efektiivselt fragmenteerida kromatiini sobiva suurusega fragmentideks.
2. Osaleda uudse RAT-ChIP-(seq) meetodi väljatöötamisel profileerides H3K4me3 ja H3K27me3 modifikatsioone 100 ja 1000 raku pealt.
3. Kasutades sekveneerimise tulemusi, võrrelda RAT-ChIP-(seq) andmeid teiste ChIP-seq meetoditega.

2.1 MATERJAL JA METOODIKA

2.2.1 Rakuliinid

Antud töös kasutati inimese erütroleukeemia K562 rakke. Rakke kasvatati DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Naxo, Eesti) söötmes. Söötme kogu mahust 10% moodustas veise loote seerum (FBS, ingl *fetal bovine serum*). Bakteriaalse saastuse vältimiseks lisasin söötmesse 1% penitsilliini/streptomütsiini (Naxo, Eesti). Rakuliine kasvatati 5% CO₂ sisalduse juures, 37°C juures inkubaatoris MCO-19AIC (Sanyo Electric Co, Jaapan). Rakkude tihedus määrati kindlaks hemotsütoomeetriga (Hausser Scientific, USA).

2.2.2 Restriksiooniensüümide testimine

Restriktaaside testimiseks võtsin rakud tihedusega 50 000 rakku 0,5µl kohta. Rakud tsentrifuugisin põhja tingimustel 1200g 3 minutit. Põhja tsentrifuugitud rakud võtsin üles vastavas koguses värskes NL puhvris (20mM TrisHCl, pH 7.4, 20mM NaCl, 6mM MgCl, 0.2% NP-40, 1/10 10x FastDiagest), et saaks soovitud tiheduse 50 000 rakku 0,5µl kohta. Rakulüsaati inkubeerisin 10 minutit jääl. Järgmisena jaotasin rakulüsaadi 0,5µl kaupa 0,2 ml PCR-i tuubidesse ning lisasin igale proovile 0,5µl vastavat restriksiooniensüümi. Testimiseks kasutasin järgnevaid ensüüme: MvaI, Hinf, AluI, SagAI, HpyF3I, FspBI, Csp6I, MspI, BsuRI, TagI (FastDiagest ensüümid, Thermo Scientific). Proove inkubeerisin 37°C juures, 5 minutit ning panin tagasi jääle. Proovidele lisasin 1µl ProtK ja 9µl 2x ProtK puhvrit (1M TrisHCl pH 7,4 0,5M EDTA 10% SDS). Proove inkubeerisin 1h 56°C juures. Peale inkubeerimist tegin DNA eraldamise DNA Clean & Concentrator- 5 kitiga (Zymo Research, USA) vastavalt tootja protokollile. Lisaks tahtsin näha kas ensüümide *star activity* 't on võimalik suurendada, selleks lisasin proovidele juurde 1,1 µl 20 mM MnCl₂, nii, et lõppkontsentratsioon tuleks 10mM proovi kohta. Selleks lugesin ära rakud ja võtsin rakud üles tihedusega 50 000 rakku 0,5µl kohta. Rakud tsentrifuugisin põhja tingimustel 1200g 3 minutit. Põhja tsentrifuugitud rakud võtsin üles vastavas koguses värskes NL puhvris (20mM TrisHCl, pH 7.4, 20mM NaCl, 6mM MgCl, 0.2% NP-40, 1/10 10x FastDiagest), et saaks soovitud tiheduse 50 000 rakku 0,5µl kohta. Rakulüsaati inkubeerisin 10 minutit jääl. Järgmisena jaotasin rakulüsaadi 0,5µl kaupa 0,2 ml PCR-i tuubidesse ning lisasin igale proovile 0,5µl vastavat restriksiooniensüümi ja 1,1µl 20 mM MnCl₂. Proove töötlesin samamoodi kui eelnevaid proove, samadel tingimustel, mis üleval välja toodud.

Tabel 2. Testitud restriksiooniensüümid

Ensüüm	Äratundmisjärjestus	Kataloogi number
AluI	AGCT	FD0014
BsuRI	GGCC	FD0154
Csp6I	GTAC	FD0214
FspBI	CTAG	FD1764
Hinfi	GATC	FD0804
HpyF3I	CTNAG	FD1884
MspI	CCGG	FD0544
MvaI	CCWGG	FD0554
SaqAI	TTAA	FD2174
TaqI	TCGA	FD0674

2.2.3 DNA puhastamine

Peale 1h inkubeerimist 56°C juures, puhastasin proovidest DNA kasutades DNA Clean & Concentrator- 5 kitti (Zymo Research, USA). Eraldamise tegin vastavalt tootja poolt kaasa pandud protokollile. Proovidele lisasin 100µl DNA sidumise puhvrit ning tõstsin Zymo-Spin kolonnis. Proove tsentrifuugisin 30 sekundit 13 000g juures ning pesin 2x 200µl DNA pesemise puhvriga, järgnes tsentrifuugimine 1 min 13 000g juures. DNA elueerisin 15µl elueerimis puhvriga. Saadud DNA kontsentratsiooni mõõtsin Nanodrop 2000 spektrofotomeetriga (Thermo Scientific, USA).

2.2.4 Gelelektroforees

Proovide kontrollimiseks kasutasin gelelektroforeesi, kasutades selleks 1,2% agarosgeeli. Geeli valmistasin 0,5x TBE puhvrist (Naxo OÜ, Eesti) ja agarospulbrist (Naxo OÜ, Eesti), selleks, et geelil DNA-d visualiseerida lisasin 50 ml geelile 5µl EtBr (etiidiumbromiid) (10 mg/ml) (Thermo Scientific, USA). Markeriks kasutasin 5µl 1kb O'GeneRuler markerit (Thermo Scientific, USA). Peale DNA kontsentratsiooni mõõtmist lisasin proovidele, mille maht oli 15 µl 2µl 6x DNA Loading Dye-d (Thermo Scientific, USA). Proovid lahutati gelelektroforeesil ja visualiseeriti Uvipro geeli dokumenteerimissüsteemi kasutades (Uvitec, Cambridge, UK).

2.2.5 RAT- ChIP-(seq)

5µl ProtG Dynabeads magnetkerasid (Thermo Fisher Scientific) pesin 2x 50µl immuunosadestamise (IP) puhvris (20mM Tris-HCl pH 7.4, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 0.1% Triton X-100). Magnetkerad võtsin üles IP puhvris ning lisasin igale proovile 0,5µl vastavat antikeha (H3K27me3 (07-449, Millipore)); H3K4me3 (07-473, Millipore)). Edasi inkubeerisin proove toatemperatuuril 2h rotaatoril. Peale inkubeerimist pesin proove 2x IP lahusega ja võtsin üles 5µl IP puhvris.

Ettekasvatatud rakkude tiheduse määrasin hemotsütomeetriga (Hausser Scientific, USA). Rakud tsentrifuugisin põhja 1200g juures 3 minutit. Rakud resuspendeerisin vastavas koguses PBS-s nii, et tihedus oleks 100 või 1000 rakku 0,5µl. Proovidele lisasin 0,5µl lüüsi/restriksioonisegu, mis sisaldab 2 µl FD puhvrit (FastDiagest); 7,5 µl 2x tuuma lüüsi puhvrit (20mM TrisHCl, pH7.4, 20mM NaCl, 6mM MgCl, 0,2% NP-40) ning 0,5µl 4x restriksiooni ensüümide segu ((AluI #FD0014, SaqAI#FD2174, HinfI#FD0804, MvaI#FD0554, FastDigest ensüümid, Thermo Scientific) ja 1µl proteaasi inhibiitorite segu (Roche Applied Science, Germany) ning inkubeerisin 15 minutit jääl ja 5 min 37°C juures. Proovidele lisasin 1µl 0,2% NaDOC/0,2% TritonX-100 segu, inkubeerisin 15 min jääl ja tegin vortexi 30 sek. Lisasin 8µl IP puhvrit ja 1µl magnetkeradega seotud antikeha. Immuunosadestamise viisin läbi 4°C kraadi juures 3,5h. *Input* prooviks võtsin võrdselt hulgal rakke järele jäänud lüüsi/restriksiooni seguga. 8µl-le rakkudele lisasin 8µl lüüsi/restriksioonisegu, mille koostis on välja toodud üleval. Suspendeerisin segu ja inkubeerisin 10 min jääl ja 5 min 37°C juures. Peale inkubeerimist panin proovid jääle ja lisasin 1µl 0,2% NaDOC/ 0,2% TritonX-100 segu ning inkubeerisin 15 min jääl ja tegin vortexi 30 sek. *Input* proovile lisasin 16µl 2x ProtK puhvrit (1M TrisHCl pH 7,4 0,5M EDTA 10% SDS) ja 1µl ProtK ning proove inkubeeriti 2h 56°C juures. Peale inkubeerimist pesin proovid 3x 100µl madala soolasisaldusega puhvriga (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl (pH 8.1)), 3x kõrge soolasisaldusega puhvriga (20 mM Tris-HCl pH=8,0, 2 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), 1x IP puhvriga ja 1x 20mM TrisHCl, pH 7,4. Järgmisena viisin läbi tagmenteerimise transposaasi segus (2,5µl tagmentation buffer, 2,5µl MQ, 0,5 µl Tn5 transposaas)(Illumina Nextera kit), inkubeerides 1 min 37°C juures. Magnetkerad pesin 1x 100µl madala soolasisaldusega puhvriga ja 1x 20mM TrisHCl pH 7,4. Proovid võtsin üles 17,5µl PCR-i puhvris, mis sisaldas 2,5µl 5µM Ad1 praimerit, 10µl 2x NEBNext PCR mix-i, 5µl mQ, lisaks lisati igale proovile 2,5µl vastavat praimerit Ad2.15, Ad2.16, Ad2.17, Ad2.18 (Tabel L2). PCR-i jaoks kasutasin PTC-200 Thermal Cycler masinat (MJ Research, MN, USA). PCR-i jaoks kasutatav programm on järgnev: 72°C 5min, 98°C 2

min, 98°C 10 sek, 63°C 10 sek, 72°C 1 min, korrata samme 3-5 15x. PCR-i proovid asetasin magnetlusele ja supernatandi tõstsin uude 0,2 ml tuubi, produktide puhastamiseks kasutasin 40µl Agencourt RNA XP magnetkerasid (Beckman Coulter, CA, USA), millele lisasin 20µl mQ. Inkubeerisin 10 minutit toatemperatuuril. Proove pesin 2x 100µl 70% EtOH-ga, kuivatasin kerasid 5 min toatemperatuuril. Proovid elueerisin 20µl TrisHCl pH 7,4 puhvriga. DNA kontsentratsiooni mõõtsin Nanodrop spektrofotomeetriga.

2.2.6 qPCR

ChIP tulemuste analüüsiks kasutasin qPCR-i. Reaktsiooni läbiviimiseks kasutasin reaktsioonisegu, mis sisaldab 1 proovi kohta 24µl mQ ja 6 µl 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis Biodyne, Tartu, Eesti), 1 µl 5µM F+R vastavaid praimereid ja 1 µl lahjendatud DNA-d RAT-ChIP-i katsest. Analüüsimiseks kasutasin 7900 HT Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems, Singapur) masinat. Programmist saadud Ct väärtustega tabeli eksportisin MS Excelisse ning analüüsisin exeli failis olevaid andmeid $\Delta\Delta C_t$ meetodiga.

Tabel 4. qPCR programm RAT-ChIP meetodi tulemuste analüüsiks.

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Aktivatsioon	95°C	15 min	1
Denaturatsioon	95°C	15 s	40
Seondumne ja elongatsioon	60°C	1 min	40
Dissotsiatsioonianalüüs	95°C; 60°C; 95°C	15s; 15s; 15s	1

2.2.7 Sekvenerimistulemuste analüüs

Pärast *pair-end* sekvenerimist, mis viidi läbi Geenivaramu tuumiklaboris, Illumina HiSEQ2500 masinaga, Rapid Run, *paired end*, 50 bp töötlesin tulemusi bioinformaatiliste programmidega. Saadud fastq failid joondasin hg19 referentsgenoomile, kasutades Bowtie2 programmi. Bowtie2 parameetrid olid järgmised: -N 1; -k 2. Järgnevalt kasutades samtools-0.1.19 versiooni indekseerisin ja sorteerisin *bam* failid *default* parameetritega.

Samuti tegin *bigwig* failid kasutades deepTools2.0 programmi järgnevate parameetritega: `bamCoverage --normalizeTo1x 2451960000 --ignoreDuplicates --minMappingQuality 40`. Saadud *bigwig* failid visualiseerisin UCSC *genome browser-is*.

2.2.8 Korrelatsioonianalüüs

Võrdlemaks RAT-ChIP meetodit teiste ChIP-seq meetoditega tegin lisaks lineaarse korrelatsioonianalüüsi. Eelnevalt bioinformaatiliste programmidega töödeldud toorandmetest saadud *bigwig* failide võrdlemiseks kasutasin veebipõhist platvormi Cistrome (Liu et al., 2011). Seal valisin analüüsi jaoks erinevate töövahendite hulgas mitme *wiggle* faili korrelatsiooni (*Multiple wiggle fail correlation*) ja kasutasin järgnevaid parameetreid: step 5; max score: 600; min score 0.

2.2.9 H3K4me3 ja H3K27me3 signaali keskmised profiilid

Võtsin GEO andmebaasist K562 rakkude RNA-seq tulemustest saadud FPKM (*fragments per kilobase of sequence per million mapped reads*) väärtustega tabeli (GSM1940168). Antud väärtused sorteerisin FPKM väärtuse järgi väiksemast suurema väärtuseni. Sorteeritud tulemused jagasin 8000 geeni kaupa kolme gruppi: madala, keskmise ja kõrge ekspressiooniga geenid. Tulemused importisin eraldi failidena MS Excelisse ja laadisin ülesse Galaxy/Cistrome veebi platvormi. Kasutades cistrome-is olevat SitePro:Aggregation plot tool for signal profiling 1.0.0 töövahendit, sain signaali profiilid H3K4me3 ja H3K27me3 jaoks. Tööriista parameetrid olid järgnevad: Sitepro behaviour mode: multiple BED vs 1wiggle/bigwig; Span H3K4me3 jaoks 2000 ja H3K27me3 jaoks 5000; profiling resolution: 50 ja consider the direction (+/-) while profiling.

2.2.10 Sekveneerimistulemuste võrdluseks kasutatud avalikud andmed

K562 rakuliinist pärit publitseeritud toorandmed, mida kasutati RAT-ChIP meetodiga saadud sekveneerimistulemuste võrdluseks ja töötlemiseks sain GEO andmebaasist. Kasutatud andmed on järgnevad (Tabel 5): GSM733680, GSM733658, GSM1782695, GSM1782755, GSM1782693, GSM1782739, GSM1918612, GSM1918613, GSM1918602, GSM1918603, GSM1918592, GSM1918593, GSM1918582, GSM1918583.

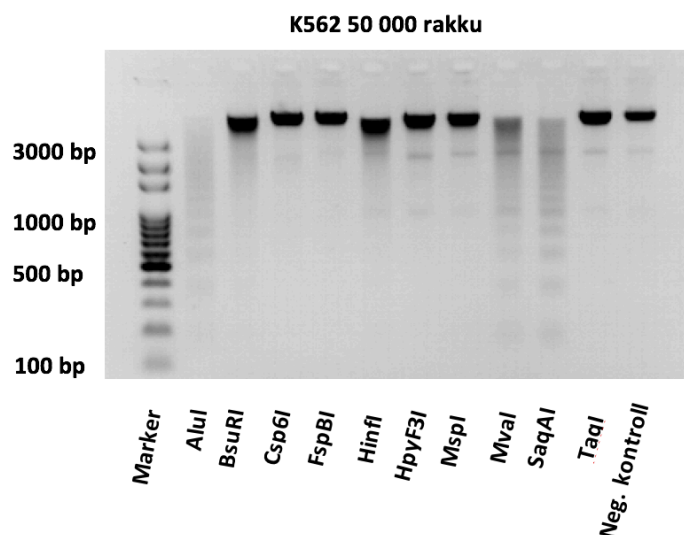
Nimi	GEO number	Histooni modifikatsioon
ENCODE Bernstein	GSM733680	H3K4me3
ENCODE Bernstein	GSM733658	H3K27me3
ChIPmentation	GSM1782695	H3K4me3
ChIPmentation	GSM1782755	H3K4me3
ChIPmentation	GSM1782693	H3K27me3
ChIPmentation	GSM1782739	H3K27me3
Mint-ChIP	GSM1918612	H3K4me3
Mint-ChIP	GSM1918602	H3K4me3
Mint-ChIP	GSM1918592	H3K27me3
Mint-ChIP	GSM1918582	H3K27me3

Tabel 5. RAT-ChIP-seq võrdluseks kasutatud avalikult kättesaadavad andmed.

2.3 TULEMUSED

2.3.1 Kromatiini fragmenteerivad restriksiooniensüümid

Kromatiini fragmenteerivate restriksiooniensüümide testimiseks teostasime kromatiini fragmenteerimise, eraldasime DNA ning visualiseerisime saadud tulemusi geelelektroforeesil (Joonis 6). Esmalt katsetasime kümne erineva restriksiooniensüümi lõikamise efektiivsust.

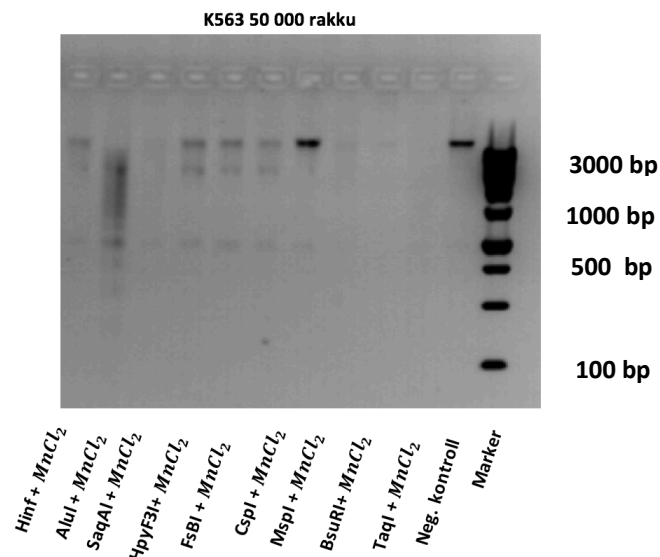


Joonis 6. Ensüümide fragmenteerimise efektiivsus.

Geelektroforeesi pildil on näha ensüümidega töötlemisel saadud kromatiini fragmendid.

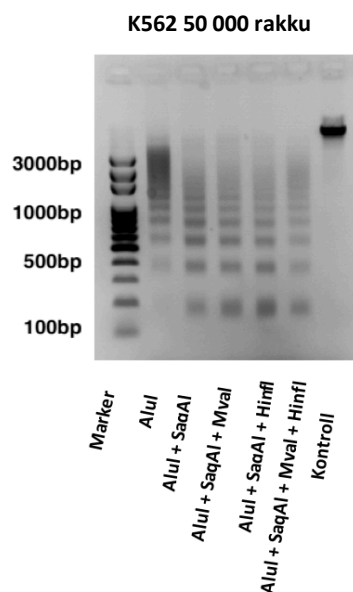
Geelektroforeesi tulemusest on näha, et kõige efektiivsemalt antud ensüümidest lõikas kromatiini AluI. Lisaks töötas lõikamine ensüümidega HinfI, SqaAI, MvaI ja BsuRI-ga. Ülejäänud ensüümidega pole nähtavat fragmenteerimist toimunud. Lõikamise efektiivsust saab hinnata nukleosoomse redeli tekkega geelil. Kuna ensüümid saavad lõigata vaba DNA-d teevad nad lõike nukleosoomide vaheliselt alalt ning moodustubki nukleosoomne redel. Umbes 150 bp lõik tähistab mononukleosoomi, 300 bp võõt dinukleosoomi ja nii vastavalt edasi olenevalt mitu nukleosoomi on jäänud lõikamiskohtade vahele.

Selleks, et näha kas kromatiini saab efektiivsemalt ja juhuslikumalt fragmenteerida, proovisin suurendada ensüümide *star-activity*-t. Selleks lisasin kirjanduse põhjal proovidele 1,1µl $MnCl_2$. Geelektroforeesi pildil olevad tulemused (Joonis 7) näitavad, et *star-activity* suurendamine pole toimunud. Thermo Fisher kodulehel on kirjas, et ensüümidel on elimineeritud *star-activity* tekkevõimalus lühikese reaktsiooni ajaga.



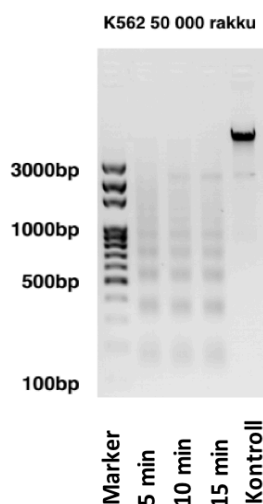
Joonis 7. Star-activity testimine. Proovidele on lisatud juurde 1,1µl $MnCl_2$. Lõikamise tulemused on näha geelektroforeesi pildil.

Kuna ühe ensüümi kasutamisel saame ChIP-i jaoks liiga suured fragmendid, siis katsetasin lõikamiseks erinevate ensüümide kombinatsiooni. Tulemusest selgus, et kõige efektiivsema lõikamise teostas ensüümide kombinatsioon: AluI, Hinf, SqaAI ja MvaI, andis kõige efektiivsema fragmenteerimise (Joonis 8).



Joonis 8. Restriksiooniensüümide kombinatsioonid. Geelelektroforeesi pildil on näha erinevate restriksiooniensüümide kombinatsioonid: teisel rajal on Alul, kolmandal Alul ja SaqAl, neljandal Alul, SaqAl ja Mval, viiendal rajal Alul, SaqAl ja HinfI. Kuuendal rajal on neli ensüümi: Alul, SaqAl, Mval ja HinfI kombinatsioon, andes kõige efektiivsema lõikamise.

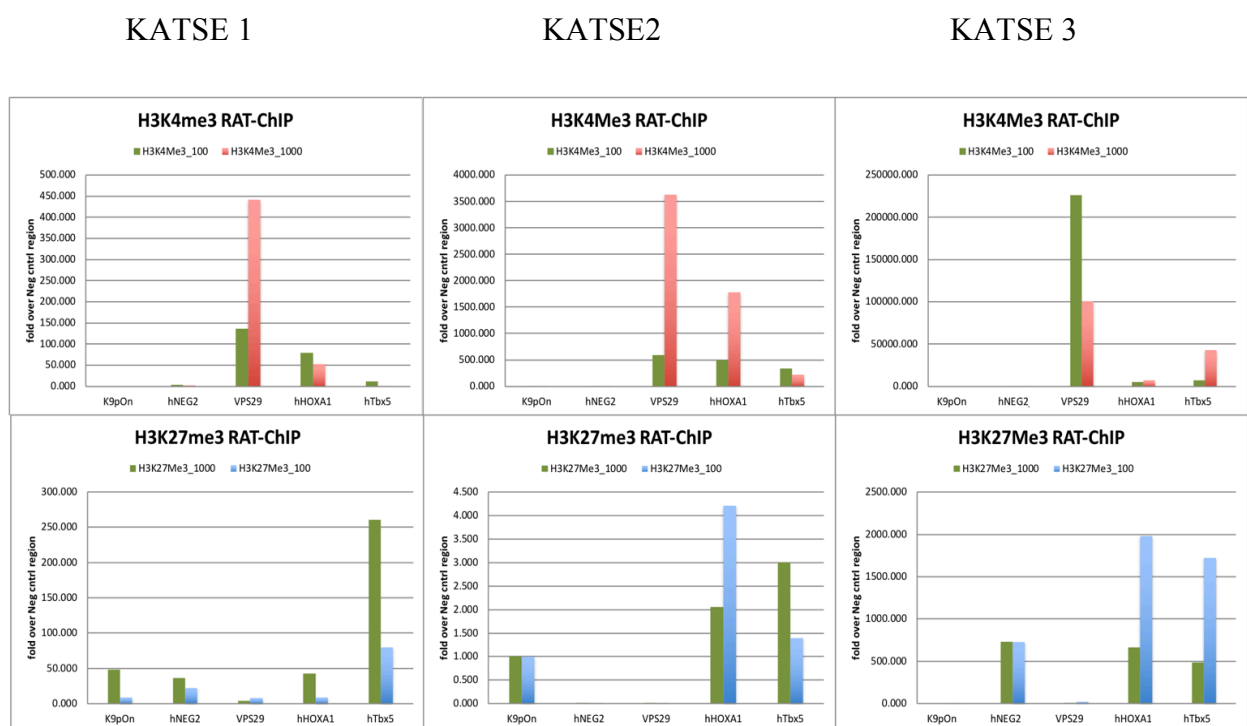
Kontrollimaks kas inkubatsiooni aeg mõjutab kromatiini fragmenteerimist viisin läbi ajalised katsed (Joonis 9). Proove inkubeerisin 5, 10 ja 15 minutit 37°C juures. Geelelektroforeesi pildilt selgub, et 5 minutit on piisav inkubatsiooniaeg ning inkubatsiooniaja pikendamine kromatiini fragmenteerimise efektiivsust oluliselt ei muuda.



Joonis 9. Restriksiooni ensüümide inkubatsiooni ajad. Geelelektroforeesi pildil on erinevad inkubatsiooni ajad- 5, 10 ja 15 minutit.

2.3.2 qPCR-i tulemused

RAT-ChIP protokolliga tehtud kromatiini immuunoadestamise järel analüüsisin modifitseeritud histoonide rikastust kvantitatiivse PCR (qPCR-i) abil (Joonis 10). Analüüsiks kasutasin H3K4me3, mida võib leida aktiivsete geenide promootorite läheduses. H3K4me3 modifikatsiooni positiivse kontrollina kasutasin analüüsis VPS29 geeni, koduhoidja geenina on tema promootoril H3K4me3 modifikatsioon. Teise modifikatsioonina kasutasin H3K27me3, mis katab enamasti repressseeritud geene. Antud modifikatsiooni kontrolliks sai valitud Hoxa1 ja Tbx5 geenide lookused.



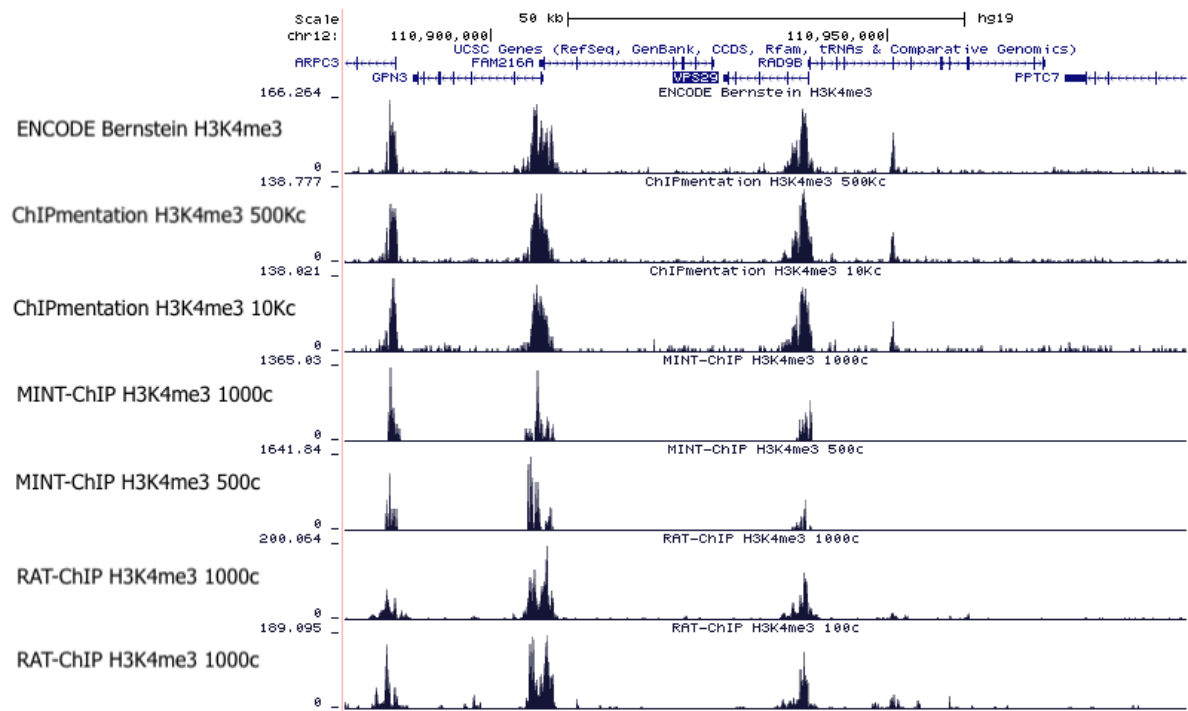
Joonis 10. Kolmest katsest saadud qPCR analüüsi tulemused. Joonisel on välja toodud kolme qPCR-i katse tulemused. Analüüsiks kasutasin H3K4me3 ja H3K27me3 vastaseid antikehasid. Kolme qPCR-i katsetulemustest on näha, et kõige suurem rikastus negatiivse kontrollregiooni suhtes H3K4me3 modifikatsiooniga on koduhoidja geeni VPS29 promootorala. VPS29-le järgnes teise signaalina HOXA1 ning Tbx5. Kuigi qPCR-i katsetulemused erinevad omavahel liigub trend siiski õiges suunas. H3K27me3 suurim rikastus leidis HOXA1 ja Tbx5 geenides. qPCR-i graafikud peegeldavad kirjanduse põhjal oodatavaid tulemusi. Tulemused näitavad, et qPCR-i meetod on võimeline detekteerima histoonide modifikatsiooni rikastusi 100 raku pealt.

2.3.3 Sekveneerimistulemused

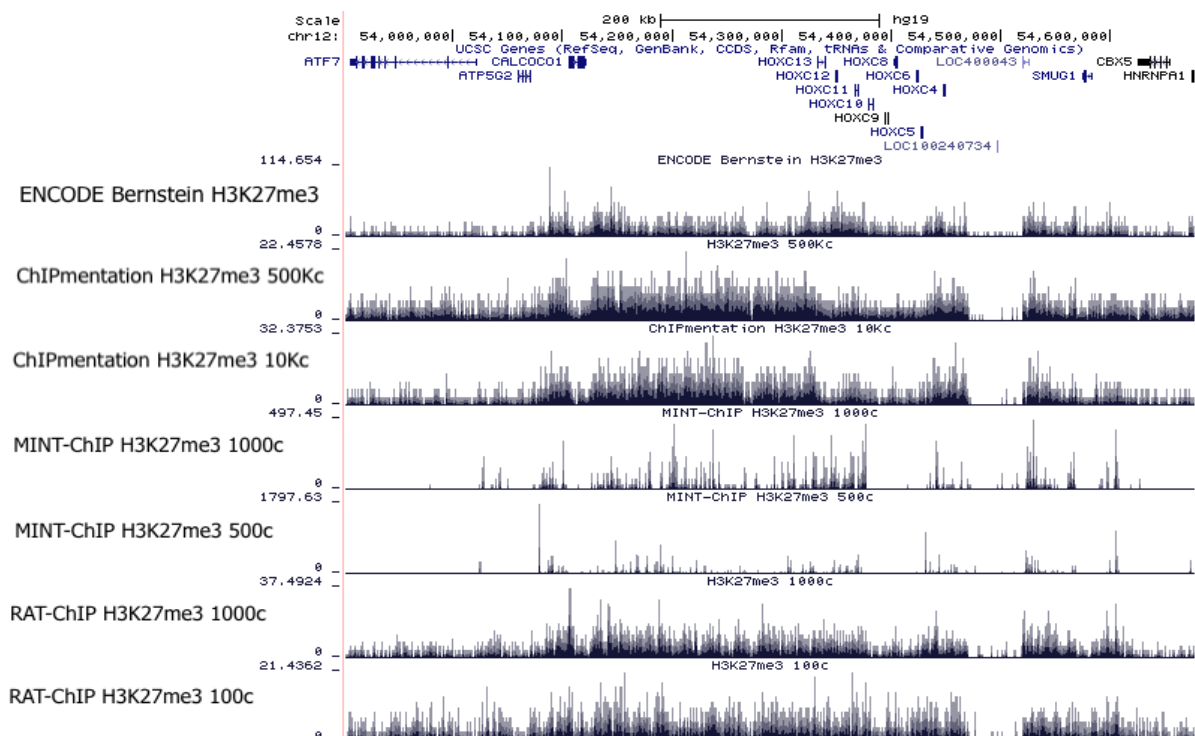
Kombineerides RAT-ChIP-i Illumina sekveneerimisega, sain genoomiüleised histoonide modifikatsiooni profiilid. Saadud sekveneerimistulemused töödeldi eelnevalt bioinformaatiliste programmidega ning *bigwig* faile visualiseeriti UCSC genoomi *browseris*. Võrdluseks võetud publitseeritud andmed on töödeldud sama moodi kui enda katsetest saadud andmed. Täpsemad programmid ja parameetrid on välja toodud materjal ja metoodika alapunktis 2.2.7. H3K4me3 modifikatsiooni võrdluseks on võetud lookus ümber koduhoidja VPS29 geeni, mille promootoralalt leiab H3K4me3 modifikatsiooni. H3K27me3 modifikatsiooni profiili jaoks on sai valitud HOXC geenide klastrid, millelt oleks näha kuidas H3K27me3 positiivsed ja negatiivsed alad vahelduvad. Tulemusi võrdlesin erinevate avalikult kättesaadavate ChIP-seq andmetega, millest MINT-ChIP ja ChIPmentation on väikserakulised ChIP-seq meetodid ning ENCODE Bernstein andmetes on kasutatud suuremal hulgal rakke (Joonis 11, 12). Erinevalt H3K37me3 modifikatsioonist on H3K4me3 modifikatsiooni puhul on näha selgeid piike, mis eristuvad üksteisest. H3K27me3 puhul on näha, et antud modifikatsioon võib olla mitmeid kb-se pikk, kattes klastritena ühtlaselt terve geeni keha. Lisas on välja toodud veel kaks geeni lookust võrdlemaks H3K4me3 ja H3K27me3 (Joonis L3, L4). Visuaalsest võrdlusest on näha, et RAT-ChIP-seq suudab anda sarnaseid tulemusi 100 raku pealt võrreldes teiste väikserakuliste meetoditega

Kasutades Galaxy/Cistrome veebipõhist platvormi, tegin RAT-ChIP meetodi täiendavaks hindamiseks globaalse korrelatsioonianalüüsi erinevate andmete vahel 5kb akentega (Joonis 13). Analüüsist on näha, et RAT-ChIP-iga saadud andmed korreleeruvad sarnaselt teiste võrreldud andmetega.

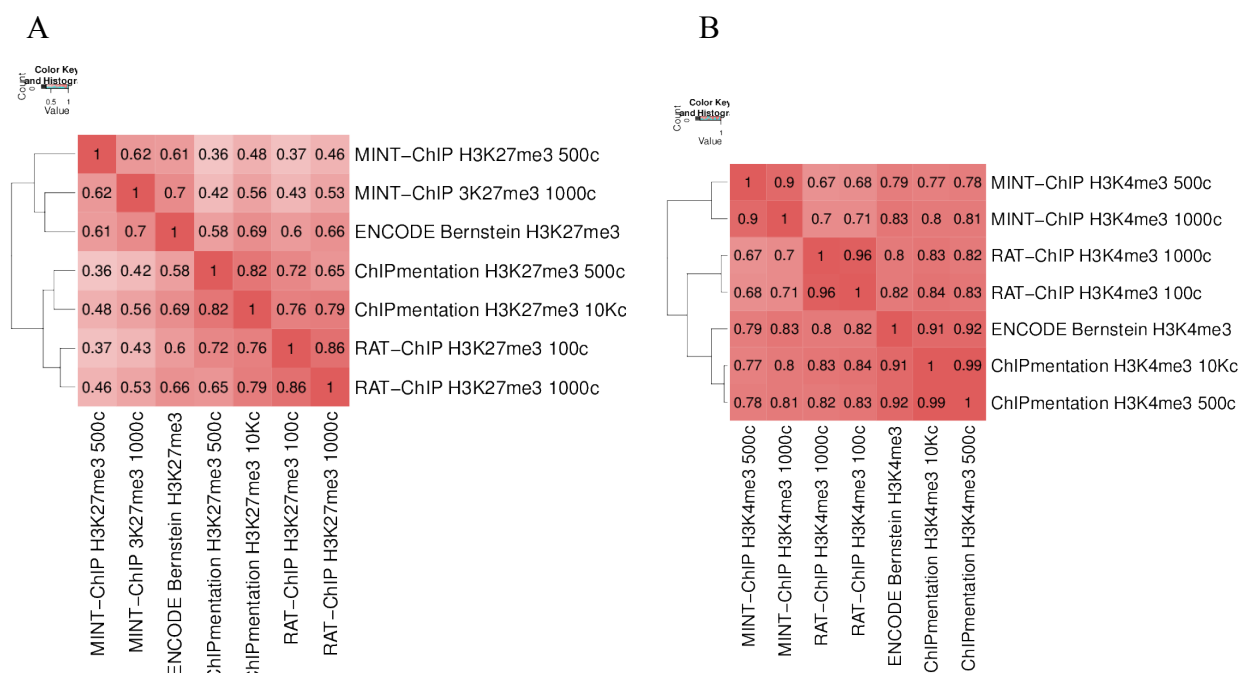
H3K4me3 ja H3K27me3 modifikatsiooni rikastuse näitamiseks K562 rakuliinis ümber erineva ekspressioonitasemega geenide transkriptsiooni alguskohtade kasutasin Galaxy/Cistrome SitePro tööriista, mis mõõdab sisendfailis defineeritud piirkondade keskmist signaali ning annab välja vastava graafiku. Analüüsi jaoks jaotasin FPKM väärtuste alusel geenid kolme gruppi: madala, keskmise ja kõrge ekspressioonitasemega gruppidesse. Kuna H3K4me3 metülatsioon on seotud aktiivsete geenide promootoraladega siis leiab teda rohkem just kõrgelt ekspresseeritud geenide transkriptsiooni algussaitidelt (Joonis 14). Vastupidiselt H3K4me3 modifikatsioonile, on H3K27me3 seotud pigem geenide repressiooniga ja seega leidub antud modifikatsiooni rohkem geenidel, mis on vaigistatud (Joonis 15). Saadud andmed on kooskõlas kirjanduse põhjal oodatavate tulemustega.



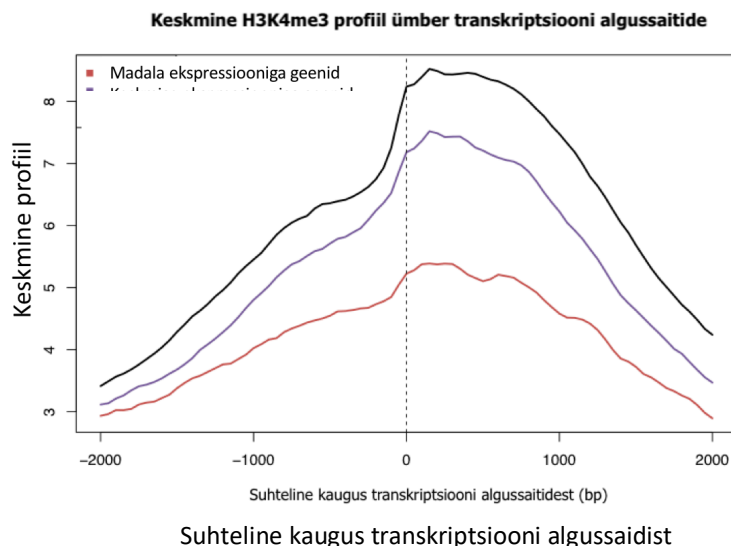
Joonis 11. H3K4me3 histooni modifikatsiooni profiilid. UCSC genoomi *browseris* visualiseeritud histooni H3K4me3 rajad 100 ja 1000 rakuga. RAT-ChIP andmeid on võrreldud teiste ChIP-seq meetoditega.



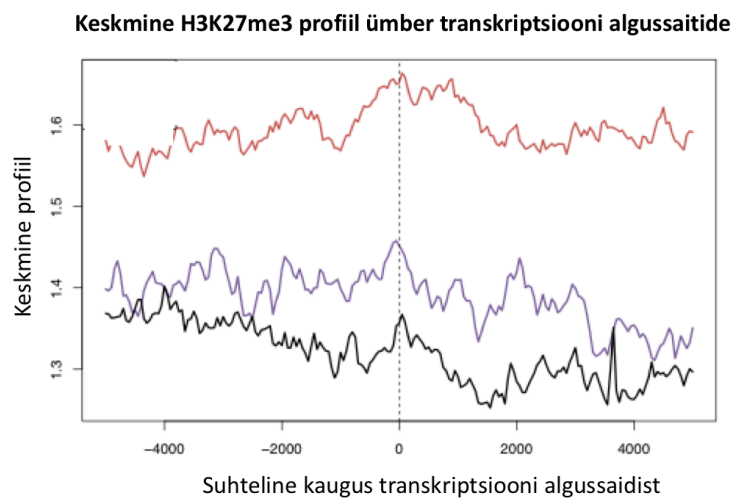
Joonis 12. H3K27me3 histooni modifikatsiooni profiilid. UCSC genoomi *browseris* visualiseeritud histooni H3K27me3 rajad 100 ja 1000 rakuga. RAT-ChIP andmeid on võrreldud teiste ChIP-seq meetoditega.



Joonis 13. Klasterdatud *heatmap* korrelatsioonianalüüsi tulemustega erinevate ChIP-seq andmetega. Joonisel A on H3K27me3 korrelatsioonianalüüs ning joonisel B H3K4me3 korrelatsioonianalüüsi põhjal klasterdatud tulemused. Punase värvi intensiivsus tähistab korrelatsioonikoefitsendi suurust ja iga võrdluse korrelatsiooni tugevust näitab arvuline r^2 väärtus on näidatud ruudu keskel. Andmeid on võrreldud teiste vabalt kättesaadavate ChIP-seq meetoditega.



Joonis 14. Keskmine H3K4me3 modifikatsiooni rikastus transkriptsiooni algussaitide ümber, geenides, mis on K562 rakuliinis jaotatud kolme ekspressioonitasemega gruppidesse. Mustaga on tähistatud kõrgelt ekspresseeritud geenid, sinisega keskmiselt ekspresseeritud geenid ja punasega madalalt ekspresseeritud geenid.

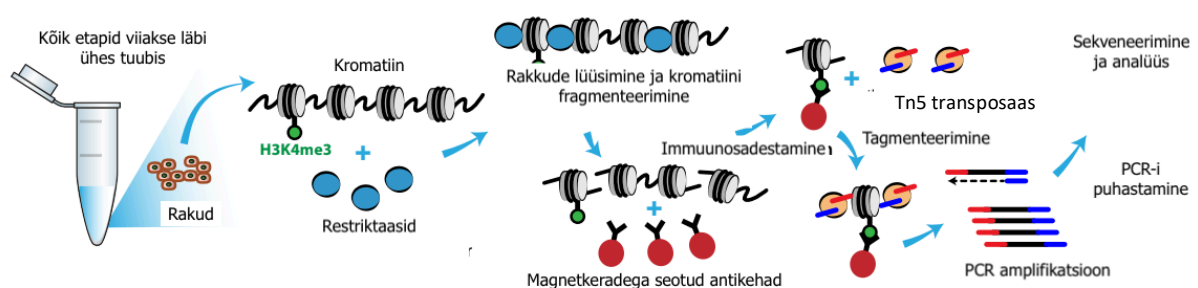


Joonis 15. Keskmine H3K27me3 modifikatsiooni profiil ümber transkriptsiooni algussaitide, geenides, mis on K562 rakuliinis jaotatud kolme ekspressioonitasemega gruppidesse Punane joon tähistab madalalt ekspresseeritud geene, sinine keskmise tasemega ekspresseeritud geene ja must kõrgel tasemel ekspresseeritud geene.

2.4 ARUTELU

Käesoleva töö eesmärgiks oli osaleda uudse RAT-ChIP meetod väljaarendamisel, mis võimaldaks histoonide modifikatsioonide profileerimist kasutades selleks 100 rakku. Meetodis kasutasin K562 rakuliini, kus algmaterjalina kasutasin 100 ja 1000 rakku. Erinevate histooni märkide uurimiseks sai valitud kaks antikeha, mis tunnevad ära aktiivsete geenide märgist H3K4me3 ja represseeritud geenide märgist H3K27me3. Histoonide suure anfiinsuse tõttu DNA suhtes puudus RAT-ChIP meetodis vajadus kromatiini ristsiduda ning sai kasutada natiivset kromatiini. Võrreldes tavapärase ChIP meetoditega, kus kasutatakse kromatiini fragmenteerimiseks sonikeerimist või MNaasi töötlust, siis RAT-ChIP-i sai valitud fragmenteerimiseks restriksiooniensüümid. Kuna meetod põhineb ristsidumata natiivsel kromatiinil, siis sonikeerimist antud meetodi puhul ei saaks rakendada. Antud juhul võib sonikeerimine rikkuda DNA ja histoonide vahelised kontaktid. Lisaks limiteerib sonikeerimise kasutamist ka see, et RAT-ChIP-is on proovide mahud üsna väiksed. Ka MNaasi töötlust ei ole antud meetodi puhul mõistlik kasutada, kuna MNaas lagundab ära kogu nukleosoomide vahele jääva vaba DNA ning hiljem ei ole võimalik kasutada Tn5 transposaasi raamatukogu valmistamisel. Meetodisse sai valitud Thermo Fisher Scientific FastDigest ensüümid kuna antud ensüüme saab omavahel kombineerida ja ensüümidel on kiire reaktsiooniaeg. Restriksiooniensüümide valik said tehtud erinevate katsete põhjal, kus testisin üksikute ensüümide lõikamist, kombinatsioonis erinevate ensüümidega ning lisaks tegin ajalise katse. Kümnest testitud ensüümist viis lõikasid DNA-d erineva efektiivsusega. Kõige efektiivsemalt lõikasid AluI ja SmaI, millele järgnesid MspI ja HinfI. Põhjus miks teised ensüümid ei lõiganud ei ole kindel, kuna kõik suudavad lõigata paljast DNA-d. Soovides kromatiini efektiivsemat ja juhuslikumat fragmenteerimist proovisin suurendada ensüümide *star-activity*-t. Selleks sai kirjanduse põhjal proovidele lisatud $MnCl_2$ (Bitinaite and Schildkraut, 2002; Nasri and Thomas, 1987), kuid tulemusest selgus, et *star-activity* suurendamine pole õnnestunud. Thermo Fisher kodulehel on kirjutatud, et nad on elimineerinud *star-activity* tekkevõimaluse lühikese reaktsioonijaga. Lisaks võivad ensüümid olla vastavalt välja töötatud, et hoida ära *star-activity* teket, sest üldjuhul ei soovita, et katsetes ebaspetsiifiline lõikamine toimuks. Kuna ensüümid ei lõika 'suvaliselt' igast nukleosoomi vaheliselt alalt, vaid ainult oma äratundmis järjestuse kohalt, siis kombineerides erinevaid ensüüme saab väiksema suurusega fragmendid. Tulemusest oli näha, et kõige efektiivsemalt lõikasid nelja ensüümi kombinatsioon, millesse kuulusid AluI, SmaI, MspI ja HinfI, antud kombinatsiooniga sai fragmendid, millest enamus jäid alla 1000 aluspaari. Ajaline test kinnitas, et 5 minutit 37° kraadi juures on piisav, et ensüümid suudaksid kromatiini fragmenteerida. Pikem inkubeerimisaeg ja kõrgem temperatuur pole vajalikud, kuna sellega võivad valgud DNA-lt dissotseeruda. Väikese hulga algmaterjaliga

töötamisel on oluline, et minimeerida meetodi etappe, kus on oht, et materjali läheb kaotsi. Enamus meetodid sisaldavad mitmeid pesuetappe ja tuubide vahetust, millega kaasneb materjali kadu. RAT-ChIP-is vajalikud etapid viiakse kõik läbi ühes tuubis ilma, et peaks pidevalt materjali uude tuubi üle kandma. Lisaks RAT-ChIP-is ei kasutata tsentrifuugimist ega DNA eraldamist, mis omakorda vähendab materjali kadu. Kasutades Tn5 transposaasi, saab lihtsalt valmistada raamatukogu ning lisaks vähendada oma fragmentide suurust raamatukogu jaoks. Transposaas ligeerib magnetkeradel olevatele DNA fragmentidele adapterid, mida saab kasutada PCR-il ja sekveneerimisel. Bioinformaatiliste programmidega töödeldud sekveneerimisandmete analüüs ning võrdlus kinnitas, et RAT-ChIP meetodiga saadud tulemused on võrreldavad teiste avaldatud andmetega ning meetodiga saab edukalt uurida nii aktiivseid, kui ka inaktiivseid kromatiini märke.



Joonis 16. RAT-ChIP meetodi ülevaade. Rakud võetakse üles lüüspuhvril, millele on lisatud nelja restriksiooniensüümi kombinatsioon, rakud lüüsitakse ja fragmenteeritakse. Lisatakse IP puhver ja antikehadega magnetkerad ning toimub immuunosadestamine. Järgnevalt viiakse läbi tagmenteerimine kasutades Tn5 transposaasi ja tehakse amplifikatsioon, millele järgneb PCR-i puhastamine. Edasi lähevad proovid sekveneerimisse ja tehakse andmete analüüs.

KOKKUVÕTE

Kromatiini immuunosadestamine ehk ChIP on praegu enim kasutust leidnud meetod uurimaks valk-DNA interaktsioone. ChIP analüüsid annavad ülevaate geeni ekspressiooniga seotud regulatsioonimehhanismidest. Tavapärastel ChIP meetoditel on mitmeid puuduseid, mis piiravad meetodi kasutamist haruldaste rakupopulatsioonide puhul. Tavapärane ChIP meetod nõuab algmaterjalina suurel hulgal rakke ning hõlmab mitmeid etappe, milles rakkude kadu on suureks probleemiks. Käesoleva töö eesmärgiks oli käsitleda antud probleeme ning arendada uutset RAT-ChIP meetodit, mis võimaldaks uurida erinevaid histooni modifikatsioone kasutades algmaterjalina 100 rakku. Uudne meetod viiakse läbi ühes tuubis, minimeerides eksperimentaalseid etappe, mis vähendab materjali kadu, lisaks kulub meetodile üks päev. RAT-ChIP meetodis kasutatakse kromatiini fragmenteerimiseks erinevate restriksiooniensüümide kombinatsioon, mis annavad sobiva suurusega fragmendid ning võimaldavad hoida proovide kogust väiksena. Raamatukogu valmistamisel kasutatav Tn5 transposaas ligeerib DNA otstesse vajalikud adapterid, mida saab kasutada PCR-il ja sekveneerimisel. Kontrollimaks meetodi efektiivsust uurisin H3K4me3 ja H3K27me3 histooni modifikatsioone, mida võib leida vastavalt aktiivsetel ja inaktiivsetel geenidel. Katse tulemused kinnitasid, et qPCR on võimeline detekteerima histooni modifikatsiooni rikastusi 100 raku pealt. Sekveneerimistulemuste võrdlus teiste väikserakuliste ChIP meetoditega näitas, et RAT-ChIP meetod annab 100 raku pealt sarnased profiilid võrreldes teiste väikserakuliste ChIP meetoditega. Tulemused näitavad, et RAT-ChIP-seq pakub alternatiivi standardsetele ChIP-seq meetoditele, pakkudes kiiret ja kulutõhusat meetodit, mis töötab hästi väikse algmaterjaliga proovide puhul.

Developing a novel RAT-ChIP method for studying histone modifications form a small number of cells

Rita Kreevan

SUMMARY

Chromatin is a complex of macromolecules found in cells, consisting of DNA, RNA and proteins of which histones are most abundant. Histones are proteins that package the DNA into structural units called nucleosomes. Chromatin plays an important role in each cell, regulating gene expression, cell division and cell repair. The way chromatin is packaged and modified is distinct in different tissues and in cell types. Thanks to the fast advances in technology, our understanding of how these epigenetic processes take place has vastly grown and given us new insight into how cells utilize genetic information.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) is a valuable method to better understand which DNA regions associate with specific histone modifications or other gene regulatory proteins. Coupled with next generation sequencing. ChIP-seq has given us new information on how different histone post-translational modifications influence gene expression by altering chromatin structure. Thus, quantitative detection of various histone modifications would provide useful information for a better understanding of epigenetic regulation of cellular processes and development.

Conventional ChIP consists of several steps - crosslinking cells, cell lysis, chromatin fragmentation, immunoprecipitation, decrosslinking, DNA purification, and library preparation followed by sequencing. Conventional ChIP methods have several restrictive conditions, thus limiting the use of the method for rare cell populations. A conventional ChIP method requires a large amount of starting material and involves several steps in which loss of material is a major concern. The aim of this work was to address these problems and develop a novel RAT-ChIP method that would allow to the study of various histone modifications using only 100 cells as a starting material. The innovative method is carried out in a single tube, minimizing experimental steps, which reduces the loss of material, and it takes only one day to finish. The RAT-ChIP method utilizes a combination of restriction enzymes for chromatin fragmentation, which produce fragments of suitable size and allows the sample volume to be kept low. The Tn5 transposase used in the library attaches the necessary DNA adapters that can be used for PCR and sequencing. To check the effectiveness of the method, I examined histone modifications of H3K4me3 and H3K27me3 that can be found in active and inactive genes. The results of the experiment confirmed that qPCR is capable of detecting the enrichment of

H3K4me3 and H3K27me3 histone modification from only 100 cells. Comparison of sequencing results with other small-cell ChIP-seq methods showed that the RAT-ChIP method provides similar or even better profiles compared to other small-cell ChIP methods. These results indicate that the RAT-ChIP-seq provides an alternative to other ChIP-seq methods, providing a fast and cost-effective method that works well for samples with small amount of starting material.

TÄNUSÕNAD

Eeskätt sooviksin tänada oma juhendajat Tõnis Orgi igakülgse abi ja toetuse eest.

Lisaks sooviksin tänada Meelis Kõivu ja oma perekonda suurepärase toetuse eest.

- Baker, K., Dhillon, T., Colas, I., Cook, N., Milne, I., Milne, L., Bayer, M., Flavell, A.J., 2015. Chromatin state analysis of the barley epigenome reveals a higher-order structure defined by H3K27me1 and H3K27me3 abundance. *Plant J.* 84, 111–124.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12963>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., Zhao, K., 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* 129, 823–837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Bitinaite, J., Schildkraut, I., 2002. Self-generated DNA termini relax the specificity of SgrAI restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1164–1169.
<https://doi.org/10.1073/pnas.022346799>
- Brind'Amour, J., Liu, S., Hudson, M., Chen, C., Karimi, M.M., Lorincz, M.C., 2015. An ultra-low-input native ChIP-seq protocol for genome-wide profiling of rare cell populations. *Nat. Commun.* 6, 6033. <https://doi.org/10.1038/ncomms7033>
- Browne, J.A., Harris, A., Leir, S.-H., 2014. An Optimized Protocol for Isolating Primary Epithelial Cell Chromatin for ChIP. *PLoS ONE* 9.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100099>
- Cao, Z., Chen, C., He, B., Tan, K., Lu, C., 2015. A microfluidic device for epigenomic profiling using 100 cells. *Nat. Methods* 12, 959–962.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3488>
- Carey, M.F., Peterson, C.L., Smale, S.T., 2009. Chromatin Immunoprecipitation (ChIP). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009, pdb.prot5279-pdb.prot5279.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot5279>
- Collas, P., 2010. The Current State of Chromatin Immunoprecipitation. *Mol. Biotechnol.* 45, 87–100. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9239-8>
- Cooper, G.M., 2000. *Chromosomes and Chromatin*.
- David, S.-A., Piégu, B., Hennequet-Antier, C., Pannetier, M., Aguirre-Lavin, T., Crochet, S., Bordeau, T., Couroussé, N., Brionne, A., Bigot, Y., Collin, A., Coustham, V., 2017. An Assessment of Fixed and Native Chromatin Preparation Methods to Study Histone Post-Translational Modifications at a Whole Genome Scale in Skeletal Muscle Tissue. *Biol. Proced. Online* 19. <https://doi.org/10.1186/s12575-017-0059-0>
- Ferrari, K.J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stützer, A., Fischle, W., Bonaldi, T., Pasini, D., 2014. Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2

- Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. *Mol. Cell* 53, 49–62.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.030>
- Furey, T.S., 2012. ChIP–seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein–DNA interactions. *Nat. Rev. Genet.* 13, 840–852.
<https://doi.org/10.1038/nrg3306>
- Gade, P., Kalvakolanu, D.V., 2012. Chromatin Immunoprecipitation Assay as a Tool for Analyzing Transcription Factor Activity, in: Vancura, A. (Ed.), *Transcriptional Regulation*. Springer New York, New York, NY, pp. 85–104.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-376-9_6
- Grewal, S.I.S., Jia, S., 2007. Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.* 8, 35–46.
<https://doi.org/10.1038/nrg2008>
- Hao, H., Liu, H., Gonye, G., Schwaber, J.S., 2008. A fast carrier chromatin immunoprecipitation method applicable to microdissected tissue samples. *J. Neurosci. Methods* 172, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.002>
- Happel, N., Doenecke, D., 2009. Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.003>
- Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C., Stam, M., 2007. Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-3-11>
- Hauer, M.H., Gasser, S.M., 2017. Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev.* 31, 2204–2221.
- Head, S.R., Komori, H.K., LaMere, S.A., Whisenant, T., Van Nieuwerburgh, F., Salomon, D.R., Ordoukhanian, P., 2014. Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. *BioTechniques* 56, 61–passim.
<https://doi.org/10.2144/000114133>
- Ji, H., 2010. Lysis of Cultured Cells for Immunoprecipitation. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.prot5466. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5466>
- Lara-Astiaso, D., Weiner, A., Lorenzo-Vivas, E., Zaretzky, I., Jaitin, D.A., David, E., Keren-Shaul, H., Mildner, A., Winter, D., Jung, S., Friedman, N., Amit, I., 2014. Chromatin state dynamics during blood formation. *Science* 345, 943–949.
<https://doi.org/10.1126/science.1256271>
- Liu, T., Ortiz, J.A., Taing, L., Meyer, C.A., Lee, B., Zhang, Y., Shin, H., Wong, S.S., Ma, J., Lei, Y., Pape, U.J., Poidinger, M., Chen, Y., Yeung, K., Brown, M., Turpaz, Y., Liu, X.S., 2011. Cistrome: an integrative platform for transcriptional regulation studies. *Genome Biol.* 12, R83. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-8-r83>

- Nasri, M., Thomas, D., 1987. Alteration of the specificity of PvuII restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 15, 7677–7687. <https://doi.org/10.1093/nar/15.19.7677>
- O’Geen, H., Echipare, L., Farnham, P.J., 2011. Using ChIP-Seq Technology to Generate High-Resolution Profiles of Histone Modifications, in: Tollefsbol, T.O. (Ed.), *Epigenetics Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 265–286. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-316-5_20
- O’Neill, L., 2003. Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods* 31, 76–82. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00090-2](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00090-2)
- Orlando, V., 2000. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.* 25, 99–104.
- Park, P.J., 2009. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat. Rev. Genet.* 10, 669–680. <https://doi.org/10.1038/nrg2641>
- Pfaffl, M., 2001. Development and validation of an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT-PCR using LightCycler SYBR Green I technology, in: *Rapid Cycle Real-Time PCR*. Springer, pp. 281–291.
- Raha, D., Hong, M., Snyder, M., 2010. ChIP-Seq: A Method for Global Identification of Regulatory Elements in the Genome, in: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2119s91>
- Rodríguez-Paredes, M., Esteller, M., 2011. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat. Med.* 17, 330–339. <https://doi.org/10.1038/nm.2305>
- Rotem, A., Ram, O., Shores, N., Sperling, R.A., Goren, A., Weitz, D.A., Bernstein, B.E., 2015. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat. Biotechnol.* 33, 1165–1172. <https://doi.org/10.1038/nbt.3383>
- Schmidl, C., Rendeiro, A.F., Sheffield, N.C., Bock, C., 2015. ChIPmentation: fast, robust, low-input ChIP-seq for histones and transcription factors. *Nat. Methods* 12, 963–965. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3542>
- Shankaranarayanan, P., Mendoza-Parra, M.-A., Walia, M., Wang, L., Li, N., Trindade, L.M., Gronemeyer, H., 2011. Single-tube linear DNA amplification (LinDA) for robust ChIP-seq. *Nat. Methods* 8, 565–567. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1626>
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26, 1135–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt1486>

- Spencer, V., 2003. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods* 31, 67–75. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00089-6)
- Tian, B., Yang, J., Brasier, A.R., 2012. Two-Step Cross-linking for Analysis of Protein–Chromatin Interactions, in: Vancura, A. (Ed.), *Transcriptional Regulation*. Springer New York, New York, NY, pp. 105–120. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-376-9_7
- Turner, B., 2001. ChIP with Native Chromatin: Advantages and Problems Relative to Methods Using Cross-Linked Material, in: *Mapping Protein/DNA Interactions by Cross-Linking*. Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris.
- van Galen, P., Viny, A.D., Ram, O., Ryan, R.J.H., Cotton, M.J., Donohue, L., Sievers, C., Drier, Y., Liao, B.B., Gillespie, S.M., Carroll, K.M., Cross, M.B., Levine, R.L., Bernstein, B.E., 2016. A Multiplexed System for Quantitative Comparisons of Chromatin Landscapes. *Mol. Cell* 61, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.11.003>
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75–85.
- Zheng, X., Yue, S., Chen, H., Weber, B., Jia, J., Zheng, Y., 2015. Low-Cell-Number Epigenome Profiling Aids the Study of Lens Aging and Hematopoiesis. *Cell Rep.* 13, 1505–1518. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.004>
- Zwart, W., Koornstra, R., Wesseling, J., Rutgers, E., Linn, S., Carroll, J.S., 2013. A carrier-assisted ChIP-seq method for estrogen receptor-chromatin interactions from breast cancer core needle biopsy samples. *BMC Genomics* 14, 232.

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

<https://www.cellsignal.com/contents/resources-applications-chromatin-immunoprecipitation/overview-of-chromatin-ip-assay-methodology/chip-assay-overview>
(2018)

LISAD

Lisa 1

Tabel L1. RAT-ChIP meetodi võrdluseks kasutatud andmed

Tabel L1. RAT-ChIP-seq võrdluseks kasutatud andmed					
Nimi	GEO number	Histooni modifikatsioon	Ekserimendi tüüp	Kasutatud rakkude arv	Referents
ENCODE Bernstein lab rep1	GSM733680	H3K4me3	Tavaline ChIP	Miljonid	ENCODE Project Consortium, 2012
ENCODE Bernstein lab rep1	GSM733658	H3K27me3	Tavaline ChIP	Miljonid	ENCODE Project Consortium, 2012
ChIPmentation	GSM1782695	H3K4me3	ChIPmentation	10000	Schmidl et al. 2015
ChIPmentation	GSM1782755	H3K4me3	ChIPmentation	500000	Schmidl et al. 2015
ChIPmentation	GSM1782693	H3K27me3	ChIPmentation	10000	Schmidl et al. 2015
ChIPmentation	GSM1782739	H3K27me3	ChIPmentation	500000	Schmidl et al. 2015
Mint-ChIP	GSM1918612	H3K4me3	Mint-ChIP	5*500	van Galen et al, 2016
Mint-ChIP	GSM1918602	H3K4me3	Mint-ChIP	5*1000	van Galen et al, 2016
Mint-ChIP	GSM1918592	H3K27me3	Mint-ChIP	5*500	van Galen et al, 2016
Mint-ChIP	GSM1918582	H3K27me3	Mint-ChIP	5*1000	van Galen et al, 2016

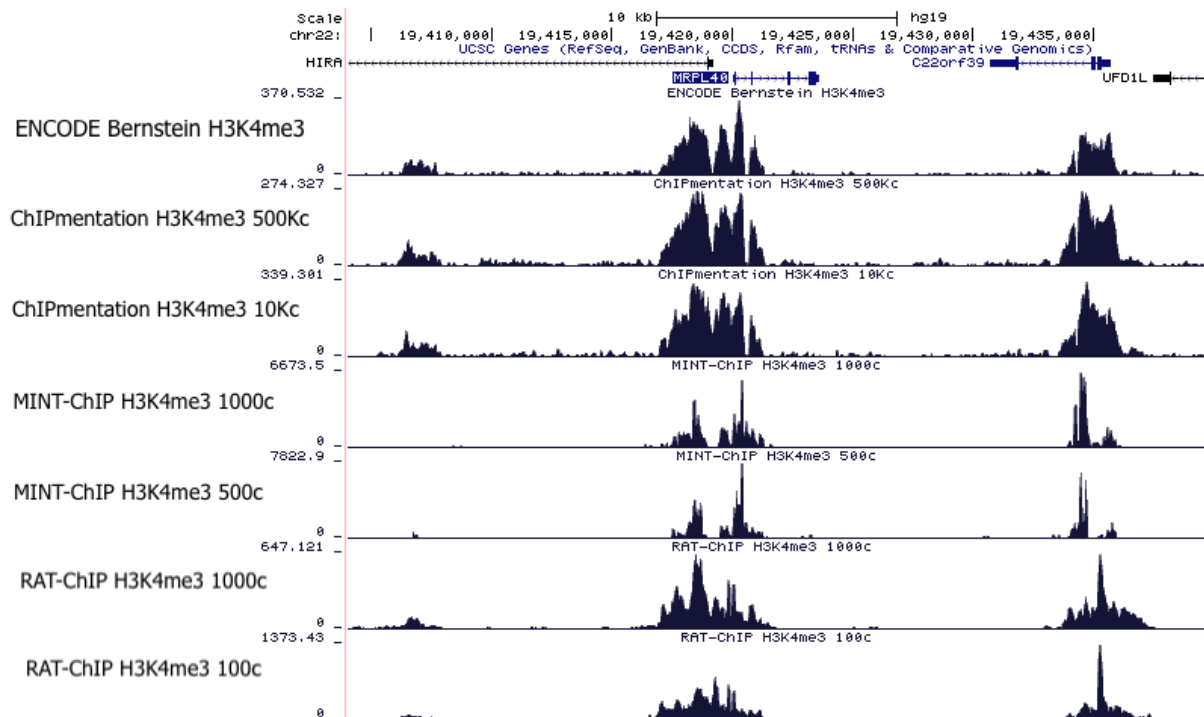
Lisa 2

Tabel L2. Kasutatud PCR primerid

Primeri nimi	Järjestus
Ad1_noM X	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCGTCGGCAGCGTCAGATGTG
Ad2.1	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCGCCTTAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.2	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTAGTACGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.15	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCAGATCCAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.16	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACAAACGGGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.17	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACCCAGCAGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT
Ad2.18	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAACCCCTCGTCTCGTGGGCTCGGAGATGT

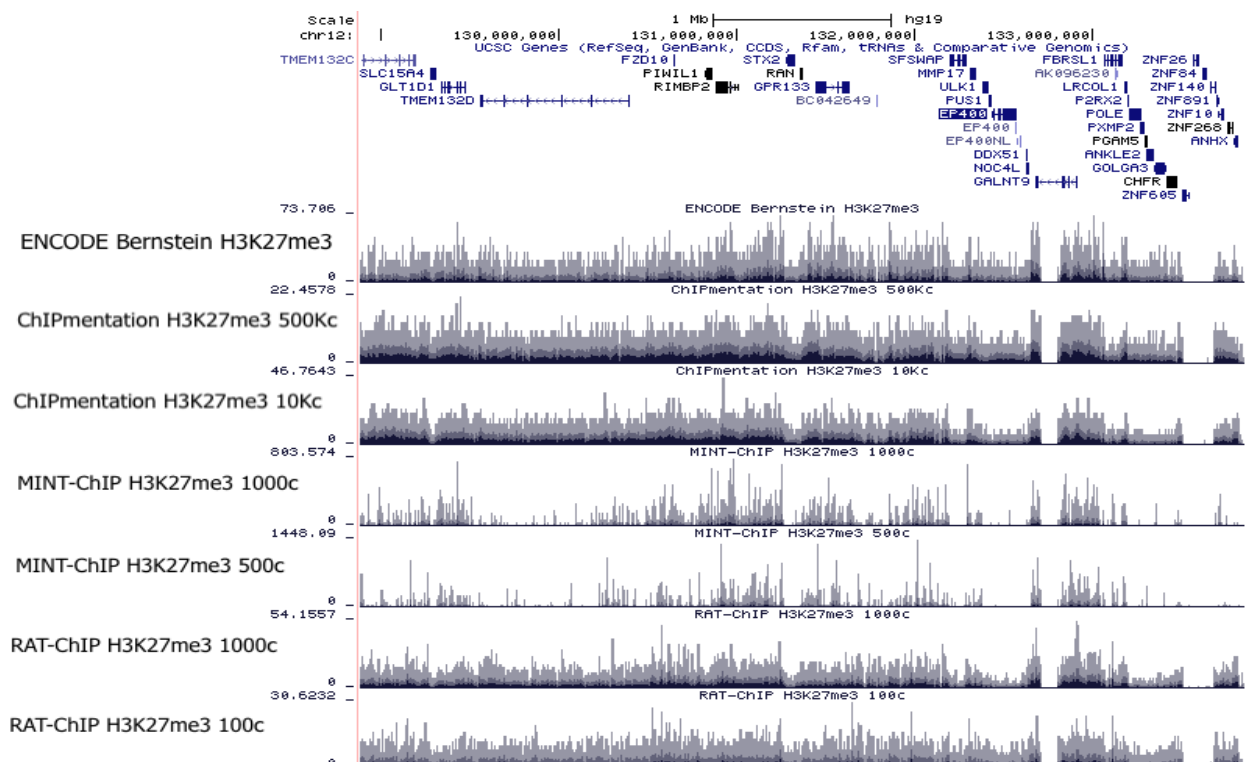
Lisa 3

Joonis L3. H3K4me3 modifikatsiooni profiil. *Bigwig* faile on visualiseeritud UCSC genoomi *browseris* ja võrreldud teiste väikserakuliste ChIP-seq meetoditega. Modifikatsiooni rikastust on vaadatud MRPL40 geeni lookuses.



Lisa 4

Joonis L4. H3K27me3 modifikatsiooni profiil. *Bigwig* faile on visualiseeritud UCSC genoomi *browseris* ja võrreldud teiste väikserakuliste ChIP-seq meetoditega. H3K27me3 modifikatsiooni võrdluseks on valitud EPHX1 geeni lookus.



LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Rita Kreevan (sünnikuupäev: 18.09.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Uudse RAT-ChIP meetodi arendamine histooni modifikatsioonide uurimiseks väikesest hulgast rakkudest

mille juhendaja on Tõnis Org,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartu 28.05.2018